

**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS  
Carrera de Ingeniería Agronómica**

**RESCATE DE GERMOPLASMA DE MANZANA EMILIA (*Malus communis* –  
Reineta amarilla de Blenheim) MEDIANTE CULTIVO DE TEJIDOS IN VITRO.  
QUITO, PICHINCHA.**

**TESIS DE GRADO PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**LENIN ALFREDO ROSERO PATIÑO**

**QUITO - ECUADOR**

**2014**

## **DEDICATORIA**

*El presente proyecto lo dedico con todo mi amor a mis padres Luis Alfredo Rosero y Olga Nohemí Patiño, por su ejemplo de responsabilidad, trabajo y sacrificio, por apoyarme y creer en mí siempre.*

*A mis hermanos Jorge, Dalila, Tania y Kerly por su amistad, su amor y sobre todo por su apoyo incondicional en mis logros y fracasos, dándome la fuerza y el aliento necesario para cumplir mis sueños.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios padre todo poderoso, por brindarme la vida, llenarme de bendiciones y permitirme alcanzar una meta más en la vida, gracias por darme fuerza, valor y perseverancia en los momentos difíciles.

A la facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central de Ecuador, y a sus buenos maestros por los valiosos conocimientos transmitidos durante mi carrera universitaria.

A los ingenieros Valdano Tafur y Ma. Isabel Ordóñez, por su motivación y ayuda incondicional en el desarrollo de esta investigación.

Al GAD Parroquial de San Miguelito- Píllaro administración 2013 especialmente al Sr. Byron Robalino por su consideración, predisposición y ayuda desinteresada. Al Lic. Luis Lara, al Sr. Hugo Ruíz y a cada uno de los moradores del Barrio Huaynacuri.

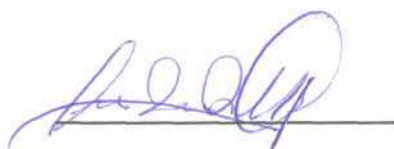
Finalmente un gracias de todo corazón a todos mis amigos y amigas, quienes directa o indirectamente aportaron con sus valiosos conocimientos para la ejecución de esta investigación.

## AUTORIZACIÓN DE LA AUTORIA INTELECTUAL

Yo, **Lenin Alfredo Rosero Patiño**. En calidad de autor del trabajo de investigación o tesis realizada sobre **“RESCATE DE GERMOPLASMA DE MANZANA EMILIA (*Malus communis* – Reineta amarilla de Blenheim) MEDIANTE CULTIVO DE TEJIDOS IN VITRO. QUITO, PICHINCHA.” “RESCUE OF APPLE EMILIA GERMPLASM EMILIA (*Malus communis* – Reineta amarilla de Blenheim) BY TISSUE CULTURE IN VITRO. QUITO, PICHINCHA.”** Por la presente autorizo a la UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR, hacer uso de todos los contenidos que me pertenecen o parte de los que contienen esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación.

Los derechos que como autor me corresponden, con excepción de la presente autorización, seguirán vigentes a mi favor, de conformidad con lo establecido en los artículos 5, 6, 8, 19 y demás pertinentes de la ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

Quito, 10 de Noviembre del 2014



**FIRMA**

**0401616123**

**leninrosero@yahoo.es**

## CERTIFICACIÓN

En calidad de tutor de trabajo de graduación cuyo título es: sobre **“RESCATE DE GERMOPLASMA DE MANZANA EMILIA (*Malus communis* – Reineta amarilla de Blenheim) MEDIANTE CULTIVO DE TEJIDOS IN VITRO. QUITO, PICHINCHA.”** Presentado por el Señor Lenin Alfredo Rosero Patiño, previo a la obtención del Título de Ingeniero Agrónomo, considero que el proyecto reúne los requisitos necesarios.

Tumbaco, 28 de Noviembre del 2014



---

Ing. Agr. Valdano Tafur Recalde.  
**TUTOR**

Tumbaco, 28 de Noviembre del 2014

Ingeniero  
Carlos Alberto Ortega, M.Sc.  
**DIRECTOR DE CARRERA DE  
INGENIERÍA AGRONÓMICA**  
Presente.-

Señor Director:

Luego de las revisiones técnicas realizadas por mi persona del trabajo de graduación, **“RESCATE DE GERMOPLASMA DE MANZANA EMILIA (*Malus communis* – Reineta amarilla de Blenheim) MEDIANTE CULTIVO DE TEJIDOS IN VITRO. QUITO, PICHINCHA.”** llevado a cabo por parte del Señor Egresado: Lenin Alfredo Rosero Patiño de la Carrera de Ingeniería Agronómica, ha concluido de manera exitosa, consecuentemente, el indicado estudiante podrá continuar con los trámites de graduación correspondientes de acuerdo a lo que estipulan las normativas y disposiciones legales.

Por la atención que se digne a dar a la presente, le anticipo mi agradecimiento.

Atentamente,



---

Ing. Agr. Valdano Tafur Recalde.  
**TUTOR**

**RESCATE DE GERMOPLASMA DE MANZANA EMILIA (*Malus communis* -Reineta amarilla de Blenheim) MEDIANTE CULTIVO DE TEJIOS IN VITRO. QUITO, PICHINCHA.**

**APROBADO POR:**

Ing. Agr. Valdano Tafur  
**TUTOR**



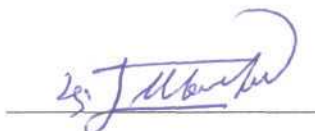
---

Ing. Agr. Aida Arteaga, M.Sc.  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**



---

Ing. Agr. Juan León, M.Sc.  
**PRIMER VOCAL**



---

Ing. Agr. Lenin Ron, M.Sc.  
**SEGUNDO VOCAL**



---

**2014**

# CONTENIDO

CAPÍTULO		PÁGINAS
<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1	OBJETIVOS	2
	Objetivo General	2
	Objetivos específicos	2
	Hipótesis	3
<b>2.</b>	<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>4</b>
2.1	Origen	4
2.2	Taxonomía	5
2.3	Descripción Morfológica	5
2.4	Requerimientos del cultivo	5
2.5	Propagación	7
2.6	Importancia	7
2.7	Cultivo de tejidos <i>in vitro</i>	7
2.8	Micropropagación	8
2.9	Consideraciones sobre la micropropagación	10
2.10	Fases de la micropropagación	27
<b>3.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>33</b>
3.1	Características del sitio experimental	33
3.2	Características del cuarto de cultivo	33
3.3	Características de la zona de colecta del material vegetal	33
3.4	Materiales	34
3.5	Metodología	35
3.5	Fase de establecimiento	36
3.7	Fase de inducción de brotes	39



<b>CAPÍTULO</b>		<b>PÁGINAS</b>
3.8	Fase de enraizamiento	41
4.	Resultados	42
4.1	Fase de establecimiento	42
4.2	Fase de inducción de brotes	64
4.3	Iniciación de la fase de enraizamiento	73
4.4	Análisis económico	76
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>78</b>
<b>6.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>79</b>
<b>7.</b>	<b>RESUMEN</b>	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>86</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>93</b>

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO		PÁG.
1	Prueba de Kolmogorov-Smirnov para la variable días a la brotación en el rescate de germoplasma de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.2014	93
2	Prueba de Levene para la variable días a la brotación en el rescate de germoplasma de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.2014.	93
3	Prueba de Kolmogorov-Smirnov para la variable número de brotes en el rescate de germoplasma de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.2014.	94
4	Prueba de Levene para la variable número de brotes en el rescate de germoplasma de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.2014.	94
5	Prueba de Kolmogorov-Smirnov para la variable longitud de brotes en el rescate de germoplasma de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.2014.	95
6	Prueba de Levene para la variable longitud de brotes en el rescate de germoplasma de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.2014.	95
7	Composición del medio de cultivo Murashige y Skoo Modificado (MSM) en el rescate de germoplasma de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.2014.	96
8	Composición del medio de cultivo CHU <i>et al</i> , .1962 (N6) en el rescate de germoplasma de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.2014.	97
9	Costos variables para formular un litro de medio de cultivo Murashige & Skoog Modificado en la evaluación de medios de cultivo en el rescate de germoplasma de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.2014.	98
10	Depresicion anual de materiales y equipos utilizados en el rescate de germoplasma de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.2014.	99

<b>ANEXO</b>		<b>PÁG.</b>
11	Costos fijos y variables en el rescate de germoplasma de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.2014.	101
12	Costos que varían para la fase de desinfección en el rescate de germoplasma de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.2014.	102
13	Costos variables para la fase de multiplicación en el rescate de germoplasma de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.2014.	103
14	Datos obtenidos para la variable brotación en el rescate de germoplasma de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.1014.	104
15	Datos obtenidos para la variable longitud de brotes contaminación en el rescate de germoplasma de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.1014.	104
16	Datos obtenidos para la variable número de brotes en el rescate de germoplasma de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.1014.	105
17	Fotografías de dificultades encontradas durante la fase de inducción de brotes de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014	105
18	Fotografía del desarrollo de brotes manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014	106
19	Inicio de la fase de enraizamiento de brotes manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014.	106
20	Aclimatación de brotes enraizados de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014.	107

## LISTA DE CUADROS

CUADRO		PÁG.
1	Clasificación taxonómica de la manzana	3
2	Tratamientos de desinfección evaluados durante la fase de establecimiento de segmentos nodales de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha. 2014.	37
3	Tratamientos utilizados en la fase de multiplicación de brotes de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) Quito, Pichincha. 2014.	39
4	Tratamientos empleados durante la fase de enraizamiento brotes de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) Quito, Pichincha. 2014.	41
5	Porcentajes de explantes contaminados de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) para los medios de cultivo CHU (N6) y MSM con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha. 2014.	42
6	Porcentajes de explantes contaminados de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) para los medios de cultivo CHU (N6) y MSM con respecto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha. 2014.	43
7	Porcentajes de explantes contaminados de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) para los medios de cultivo CHU (N6) y MSM de acuerdo a cada tratamiento de desinfección. Quito, Pichincha. 2014.	45
8	Porcentajes de explantes contaminados de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) para cada nivel de concentración de hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha. 2014.	46
9	Porcentajes de explantes contaminados de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) para cada tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha. 2014.	47
10	Porcentajes de explantes oxidados de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) en MSM y CHU (N6) con respecto a la concentración de NaClO. Quito, Pichincha. 2014.	50
11	Porcentajes de explantes oxidados de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) en los medios MSM y CHU (N6) con respecto al tiempo de inmersión en NaClO. Quito, Pichincha. 2014.	51

CUADRO		PÁG.
12	Porcentaje de explantes oxidados de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) en los medios de cultivo MSM y CHU (N6) con respecto a cada tratamiento de desinfección. Quito, Pichincha. 2014.	52
13	Porcentajes de explantes oxidados de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha. 2014.	53
14	Porcentajes de explantes oxidados manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) con respecto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha. 2014.	54
15	Porcentajes de explantes viables de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) en los medios de cultivo MSM y CHU (N6) con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha. 2014.	57
16	Porcentajes de explantes viables de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) en los medios de cultivo MSM y CHU (N6) con respecto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha. 2014.	58
17	Porcentajes de explantes de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) viables en los medios de cultivo MSM y CHU (N6) de acuerdo a cada tratamiento de desinfección.	59
18	Porcentajes de explantes viables de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha. 2014.	60
19	Porcentajes de explantes viables de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) con respecto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha. 2014.	61
20	Análisis de varianza para la variable días a la brotación en la fase de multiplicación de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha. 2014.	65
21	Promedios para el factor medios de cultivo en la evaluación de concentraciones de BAP durante la fase de inducción de brotes de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha. 2014.	66
22	Tukey al 5% para el factor dosis de BAP en la variable días a la brotación durante la fase de multiplicación de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim).	66
23	Días a la brotación para la interacción Medios x BAP durante la fase de inducción de brotes de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha. 2014.	67

CUADRO		PÁG.
24	Análisis de varianza para la variable número de brotes en la fase de multiplicación de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha. 2014.	68
25	. Promedios número de brotes en la evaluación de cuatro concentraciones de BAP durante la fase de inducción de brotes de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha. 2014.	68
26	Promedios número de brotes en la evaluación de cuatro concentraciones de BAP durante la fase de inducción de brotes de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha. 2014.	68
27	Número de brotes para la interacción Medios x BAP durante la fase de multiplicación de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha. 2014.	69
28	Análisis de varianza para la variable número de brotes en la fase de multiplicación de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha. 2014.	71
29	Promedios de longitud de brotes en la evaluación de cuatro concentraciones de BAP durante la fase de inducción de brotes de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha. 2014.	72
30	Promedios de longitud de brotes en la evaluación de cuatro concentraciones de BAP durante la fase de inducción de brotes de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha. 2014.	72
31	Promedio de longitud de brotes para la interacción Medios x BAP durante la fase de multiplicación de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim).	73
32	Costos que varían y beneficios netos para la desinfección de explantes de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014.	76
33	Tasa de retorno marginal para la desinfección de explantes de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014.	76
34	Costos que varían y beneficios netos para la fase de brotación de explantes de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014.	77
35	Tasa de retorno marginal para la desinfección de explantes de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014.	77

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO		PÁG.
1	Representación esquemática del método de explantes nodales, para la propagación vegetativa de plantas.	10
2	Número de explantes contaminados de manzana Emilia ( <i>Malus comunis</i> -reineta amarilla de Blenheim) en los medios de cultivo MSM y CHU (N6) con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha. 2014.	43
3	Porcentaje de explantes contaminados de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) con respecto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha. 2014.	44
4	. Número de explantes contaminados de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) para los medios de cultivo MSM y CHU (N6) de acuerdo a cada tratamiento de desinfección. Quito, Pichincha. 2014.	45
5	Porcentaje de explantes contaminados de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) en las diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha. 2014.	46
6	Porcentaje de explantes contaminados de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) para cada tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha. 2014.	47
7	Porcentaje de explantes contaminados de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) de acuerdo a cada tratamiento de desinfección. Quito, Pichincha. 2014.	48
8	Número de explantes oxidados de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) en los medios de cultivo MSM y CHU (N6) con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha. 2014.	50
9	Número de explantes oxidados de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) en los medios de cultivo MSM y CHU (N6) con respecto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha. 2014.	51
10	Número de explantes oxidados de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) para los medios de cultivo MSM y CHU (N6) con respecto a cada tratamiento de desinfección. Quito, Pichincha. 2014.	52

11	Porcentajes de explantes oxidados de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha. 2014.	54
12	Porcentaje de explantes oxidados de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) con respecto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha. 2014.	55
13	Porcentajes de explantes oxidados de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) con respecto a cada tratamiento. Quito, Pichincha. 2014.	55
14	Número de explantes viables de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) en los medios de cultivo MSM y CHU (N6) con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha. 2014.	58
15	Número de explantes viables de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) en los medios de cultivo MSM y CHU (N6) con respecto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha. 2014.	58
16	Número de explantes viables de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) en los medios de cultivo MSM y CHU (N6) de acuerdo a cada tratamiento de desinfección. Quito, Pichincha. 2014.	59
17	Número de explantes viables de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha. 2014.	61
18	Número de explantes viables de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) con respecto al tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha. 2014.	62
19	Porcentajes de explantes viables de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim) con respecto a cada tratamiento de desinfección. Quito, Pichincha. 2014.	63
20	Promedio de días a la brotación en la evaluación de cuatro concentración de BAP durante la fase de multiplicación de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha. 2014.	66
21	Promedio número de brotes en la evaluación de cuatro concentración de BAP durante la fase de multiplicación de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha. 2014.	70



**GRÁFICO****PÁG.**

22	Promedio de longitud de brotes en la evaluación de cuatro concentración de BAP durante la fase de multiplicación de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha. 2014.	73
23	Respuesta del tratamiento 2 (0,5mg/L de IBA) en la fase enraizamiento de brotes de manzana Emilia ( <i>Malus communis</i> -Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha. 2014.	75

# **RESCATE DE GERMOPLASMA DE MANZANA EMILIA (*Malus communis* – Reineta amarilla de Blenheim) MEDIANTE CULTIVO DE TEJIDOS IN VITRO. QUITO, PICHINCHA.**

## **RESUMEN**

En el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central del Ecuador se realizó el rescate de germoplasma de manzana Emilia (*Malus communis* – Reineta amarilla de Blenheim) mediante el cultivo de tejidos *in vitro*, con el objetivo de evaluar medios de cultivo para la micropropagación, como herramienta para recuperar esta especie. Para el establecimiento se probaron dos medios de cultivo (MSM y CHU), y 6 tratamientos de desinfección. El tratamiento que presentó menor contaminación y oxidación fue con hipoclorito de sodio al 10% durante 15 minutos, obteniéndose un 77% de viabilidad. Para la fase de brotación se probaron 4 concentraciones de BAP. Siendo el mejor tratamiento el medio de cultivo CHU suplementado con 1,0 ppm de BAP, el mismo que permitió obtener un promedio de 3,2 brotes por explante con un tamaño de 6,20 cm.

**PALABRAS CLAVES:** CULTIVO IN VITRO, MANZANA, REINETA AMARILLA DE BLENHEIM, GERMOPLASMA, VARIEDAD.

# **RESCUE OF APPLE EMILIA GERMPLASM EMILIA (*Malus communis* – Reineta amarilla de Blenheim) BY TISSUE CULTURE IN VITRO. QUITO, PICHINCHA.**

## **SUMMARY**

In the Laboratory of Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences of the Central University of Ecuador rescuing Emilia apple germplasm (*Malus communis* – Reineta amarilla de Blenheim) was performed using tissue culture in vitro the aim of this study was to evaluate culture media for micropropagation of apple Emilia as a tool to recover this species. For establishing two culture media, and 6 disinfection treatments. The treatment in both culture media showed less contamination and oxidation was sodium hypochlorite at 10% for 15 minutes, yielding 77% viability. Among MSM and CHU For budding stage 8 treatments using different concentrations of BAP were tested. The best treatment was using the culture medium supplemented with 1.0 ppm CHU BAP, which allowed to obtain the same average of 3.2 shoots per explant with a size of 6.20 cm.

**KEYWORDS:** IN VITRO CULTURE, APPLE, YELLOW PIPPIN BLENHEIM, GERMPLASM, VARIETY.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de manzana en el país es tan antiguo como su historia colonial, donde los productores locales, que en su mayoría poseen huertos familiares en los cuales se usan técnicas muy antiguas, con un desconocimiento de las técnicas modernas usadas entre los principales productores (Montalván, N. citado por Criollo, 2011).

En Ecuador por su posición geográfica y la presencia de la cordillera de los Andes, determinan la existencia de ecosistemas con una riqueza natural privilegiada, (Vallejo, 2007) permitiendo que el cultivo de manzana cuente con una producción local autosuficiente localizada en las provincias centrales, principalmente en Tungurahua; sin embargo en los últimos 12 años factores como: la crisis financiera local del año 98, la baja productividad en la producción de manzanas, la apertura de mercados externos y la creciente demanda por la fruta, evidencia que actualmente el 85% del consumo interno de manzana sea importado (PROCHILE, 2011).

La variedad Emilia es una de las frutas emblemáticas y más representativas para la provincia de Tungurahua, de esta manera a llegando a concebirse como símbolo de cultura y tradición entre sus pueblos. Sin embargo en las dos últimas décadas se ha visto amenazada por factores como las importaciones de fruta, la baja productividad, el descuido por parte de autoridades y del agricultor, continuas erupciones volcánicas, entre otros. Los cuales conllevan a la pérdida de la diversidad frutícola en nuestro país (Lara 2010).

De esta forma, se da la búsqueda de nuevas alternativas que aporten a una a la economía agrícola e industrial de la zona central del país, en la cual se toma en cuenta una de las principales frutas representativas cultivadas en la provincia de Tungurahua, como es la manzana, variedad Emilia (*Malus communis* -Reineta Amarilla de Blenheim), que presenta cualidades muy apetecidas por el consumidor final como su jugosidad, dulzor y sabor (Salazar, 2010).

La Estrategia mundial para la conservación de especies vegetales (GSPC) El 16° Congreso Internacional de Botánica en St. Louis, Missouri, en 1999 instó que la conservación de las plantas sea reconocida como una destacada prioridad mundial dada la continua pérdida de la diversidad vegetal. Seguirá siendo de vital importancia para las especies amenazadas el tener intervenciones de conservación previstas explícitamente para lograr su conservación. (FAO- wiews, 2010), permitiendo prevenir posibles extinciones de plantas y recuperando especies amenazadas que aporten en la seguridad y soberanía alimentaria de generaciones futuras (INIAP, 2013).

La micropropagación tiene usos significativos en la propagación vegetativa de especies y cultivares de importancia (Roca, 1997), en el cual un explante se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida en donde los requerimientos nutricionales para un crecimiento óptimo de un tejido in vitro puede variar con la especie inclusive tejidos de diferentes partes de una planta pueden tener requerimientos diferentes para un crecimiento satisfactorio (Murashige & Skooge, citado por Roca, 1997) y se incuba en condiciones ambientales controladas, objetando uno de los múltiples propósitos de la micropropagación como es el rescate y conservación de germoplasma (Hartmann, 1997).

Por lo general los manzanos se propagan vegetativamente siendo el acodo el más común, los de más difícil enraizamiento se someten a micropropagación (Sotomayor, 2003). La regeneración de plantas sanas partiendo del cultivo in vitro de ápices meristemáticos de ciertos vegetales leñosos exige la búsqueda de técnicas complejas y su empleo acertado, estas técnicas deben permitir al explante sortear frecuentes dificultades como la oxidación, la heterogeneidad de respuestas, la reversión al estado juvenil, la presencia de inhibidores de enraizamiento y sobre todo la sobrevivencia al trasplante en condiciones autótrofas (Hartmann, 1997).

La micropropagación de la manzana ha jugado un papel importante en la producción de plantas sanas, libres de enfermedades y en la rápida multiplicación de esquejes y porta injertos con características deseables, éxito que se lo obtiene con meristemas pre-existentes (cultivo de yemas apicales o segmentos nodales) (Dobrannszki, 2010), siendo hasta la fecha la técnica que ha trascendido con éxito de los ámbitos experimentales a la práctica (IICA, 2010).

## **OBJETIVOS**

### **1.1. Objetivo General**

Evaluar medios de cultivo para la micropropagación de manzana Emilia (*Malus communis* - Reineta Amarilla de Blenheim) como alternativa para el rescate de esta especie.

### **1.2. Objetivos Específicos**

1.2.1. Identificar el medio óptimo de desinfección para reducir la contaminación

1.2.2. Establecer las concentraciones adecuadas de 6-bencil amino purina (BAP) para inducir la brotación, y de ácido indolbutírico (IBA) para inducir al enraizamiento.

1.2.3. Aclimatar las plantas obtenidas in vitro.

1.2.4. Determinar un análisis financiero de los tratamientos en estudio.

### 1.3. Hipótesis

**Ho:** Existe un protocolo para el rescate de germoplasma de manzana Emilia (*Malus communis* - Reineta Amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro.

**Ha:** No existe un protocolo para el rescate de germoplasma de manzana Emilia (*Malus communis* - Reineta Amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro.

**Ho:** Las concentraciones de Hipoclorito de sodio presentan respuestas similares en la desinfección de explantes de manzana Emilia

**Ha:** Las concentraciones de Hipoclorito de sodio presentan respuestas diferentes en la desinfección de explantes de manzana Emilia

**Ho:** Los tiempo de inmersión en Hipoclorito de sodio presentan respuestas similares en la desinfección de explantes de manzana Emilia

**Ho:** Los tiempo de inmersión en Hipoclorito de sodio presentan respuestas diferentes en la desinfección de explantes de manzana Emilia

**Ho:** Las concentraciones de 6-bencilaminopuria (BAP) para estimular la brotación presentan efectos similares en la micropropagación de manzana Emilia

**Ha:** Las concentraciones de 6-bencilaminopuria (BAP) para estimular la brotación no presentan efectos similares en la micropropagación de manzana Emilia

**Ho:** Las concentraciones de ácido indolbutírico (IBA) para estimular el enraizamiento presentan efectos similares en la micropropagación de manzana Emilia

**Ha:** Las concentraciones de ácido indolbutírico (IBA) para estimular el enraizamiento no presentan efectos similares en la micropropagación de manzana Emilia

**Ho:** Las interacciones entre medios de cultivo y dosis de (BAP, IBA) presentan efectos similares en la micropropagacion de manzana Emilia

**Ho:** Las interacciones entre medios de cultivo y dosis de (BAP, IBA) presentan efectos distintos en la micropropagacion de manzana Emilia

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

La manzana es sin duda una de las frutas de mayor interés ya que es el frutal de mayor producción a nivel mundial con 71,2 millones de toneladas en el 2009 (USDA, 2013), superando incluso a la de naranjas, plátanos, uvas, etc.

China es el país líder, ya que supera los 25 millones de toneladas anuales; le siguen Estados Unidos (más de 5 millones de toneladas) y un grupo de países (Turquía, India, Rusia, Polonia, Chile e Irán) con una cosecha anual semejante (alrededor de 2,1 millones de toneladas. Dos tercios de las exportaciones mundiales de manzanas son controladas por seis países exportadores: China, Chile, Italia, Estados Unidos, Polonia y Francia. Sin embargo hay un número importante de regiones donde se cultivan variedades autóctonas o antiguas con sistemas culturales tradicionales. Allá donde el mercado local o regional reconoce y valora la fruta del lugar (Coque, *et al.*, 2012).

En el Ecuador el cultivo de manzana (*Malus domestica* Bork) ocupa el lugar más destacado y el de mayor consumo, el mismo que hasta la actualidad se ha venido manejando de forma tradicional (INIAP, 1991); en los cuales la mayoría de los huertos son familiares y existe un desconocimiento de las técnicas modernas usadas entre los principales productores (Montalván, 2009).

### 2.1. ORIGEN

Se desconoce la genealogía exacta del manzano, aunque se cree que procede del cruzamiento y selección de varias especies de manzanos silvestres europeos y asiáticos. Se presume que lo más probable es que proceda de la especie *Malus sieversii* Ledeb cuyo origen se sitúa hace 15.000 o 20.000 años en el centro de Asia. Más precisamente en el sur de Kazajistán, Kirguistán, Tayikistán y Xinjiang (provincia de China) (Gittins, 2013).

Se dice que la manzana fue introducida en América tras la colonización. Ecuador fue uno de los países que cultivó el manzano a raíz de la colonia y hasta la época de los 90, constituyó el cultivo frutal más destacado para la región central (Soria, 1992 y Pérez *et al.*, 2001).

Originaria de Europa central. En año de 1932, el señor Emilio María Terán introdujo al cantón Píllaro una variedad llamada Reineta o Reineta de Reinetas (Bonilla, 1987 citado por Criollo, 2011). Emilio María Terán se radica en lo que hoy es San Miguelito y Emilio María Terán antiguamente Cunulivi y Rumipamba, aficionado y experimentador en los frutales en especial por

las manzanas, le bautiza a una de ellas por su sabor único y agradable con el nombre de Emilia en honor a su hijo Emilio Terán (Lara, 2010).

## 2.2. TAXONOMÍA

La clasificación taxonómica de la manzana se presenta en la Cuadro 1.

Las variedades de manzanas existentes son producto de cruzamientos y adaptación al medio a través del tiempo (De la Fuente y Blázquez, 2009).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la manzana.

<b>Reino</b>	Vegetal
<b>División</b>	Espermatophyta
<b>Subdivisión</b>	Angiosperma
<b>Clase</b>	Dicotyledonea
<b>Orden</b>	Rosales
<b>Familia</b>	Rosaceae
<b>Subfamilia</b>	Pomoidea
<b>Género</b>	Malus
<b>Especie</b>	<i>M. domestica</i> L.
<b>Nombre científico</b>	<i>Malus sylvestris</i> Miller (o <i>Malus communis</i> ) <i>Pyrus malus</i> L.

**Fuente:** (Valpiana, 1997 y Pacheco, 1978 citados en Bayas, 1989).

## 2.3. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

El árbol es vigoroso, ancho, de buenos rendimientos, susceptible al viento, de cosecha tardía ya que tiende a florecer en octubre y los frutos se cosechan desde febrero hasta mayo (Bonilla, 1987; Mertz, 1982 citado por Bayas, 1989).

Los frutos son grandes, esféricos, achatados en los polos y de forma regular. Su peso puede variar entre 140 g y 200g aunque existen frutos de mayor tamaño. La corteza es de color amarillo-verdosa y la cara expuesta al sol es amarilla-oro con un lado rosado a rojo. El pedúnculo es corto y grueso. La pulpa es de color blanco-amarillento, dulce, jugosa, cuando se cosecha tarde es harinosa y muy aromática. Buena para el transporte y manejo, no se conserva bien en frigorífico. (Saltos, 1993



citado por Salazar, 2010). Es utilizada para consumo en fresco, para asarlas o como ingrediente adicional en repostería.



Fotografía 1. Frutos de manzana Emilia.

## **2.4. REQUERIMIENTOS DEL CULTIVO**

### **2.4.1. Altitud**

Las zonas donde el manzano tiene su mayor producción se encuentran situadas entre los 2 500 y 3 200 msnm, correspondientes a la zona climática equinoccial templada. En el Ecuador, esta zona se localiza en la parte central, pero el cultivo de manzana se concentra en las provincias de Tungurahua, Chimborazo y Azuay (Soria, y León, 1992).

### **2.4.2. Clima**

El manzano es una especie frutal poco exigente en cuanto al clima, sus niveles de tolerancia varían según la variedad, pero debido a su procedencia de zonas frías resiste temperaturas inferiores a -10 °C (Valpiana, 1997; Álvarez, 1983). A pesar de la resistencia del manzano, para lograr producciones elevadas, es importante conocer sus necesidades de frío, insolación, humedad y el efecto de las heladas sobre la floración (Álvarez, 1983; Auda, 1977 citado por Guerrero y Silva, 1992)

En Ecuador, se logra un comportamiento adecuado del manzano con una temperatura entre 12 ° y 17 °C, lo cual permite una acumulación de 400 a 600 horas frío. Este clima, predominante en la zona central del país permite la presencia de períodos lluviosos favorables para el desarrollo vegetativo y la fructificación; y períodos secos que permitan la caída de las hojas (Soria, y León, 1992). Requiere, también, de 700 a 1 000 mm de precipitación anual (INIAP, 1997).

### **2.4.3. Suelo**

Debido a que el aparato radical del manzano es superficial, crece en una gran variedad de suelos excepto aquellos extremadamente calcáreos, húmedos o áridos (Valpiana, 1997).

Para el cultivo, se prefiere suelos francos, franco –arenosos o silíceo –arcillosos profundos, ricos en materia orgánica, pH comprendido entre 5,8 y 7,5 y buen drenaje. Es importante que el terreno posea una inclinación del 5% o 10% para evitar daños por heladas (Soria, y León, 1992; INIAP, 1997).

### **2.5. PROPAGACIÓN**

Para la multiplicación y propagación de plantas de manzano, se recomienda el uso de patrones franco (provenientes de semilla), sobre los cuales se deben injertar las variedades más promisorias, también se pueden emplear patrones semi enanizantes, que pueden ser exitosos cuando las condiciones de suelo y manejo son adecuados. La línea mejor adaptada es MM-106 que presenta características de tolerancia a pulgón lanígero y posibilidad de incremento del número de plantas por hectárea (Soria, y León, 1992; INIAP, 1997).

### **2.6. IMPORTANCIA**

El Señor Emilio María Terán fue fundador de la fiesta de las manzanas, realizada en agradecimiento a la madre tierra por la productividad de sus frutas, en donde se consideró a la manzana Emilia como uno de los símbolos de esta tierra, ya que esta era una de las principales fiestas que tenía la actual parroquia de San Miguelito extendiéndose hasta Emilio María Terán, lamentablemente la aculturización ha hecho que lo nuestro pierda el espacio de su tierra (Lara, 2013).

Esta variedad de manzana es una de las frutas más apropiadas para la elaboración de vino por su sabor agradable color, sabor y aroma (Salazar, G. 2010) se utiliza tradicionalmente en los postres para hornear con mantequilla, miel de abeja o azúcar y canela (Diario EL Comercio, 2011).

### **2.7. CULTIVO DE TEJIDOS *IN VITRO***

El cultivo de tejidos vegetales significa cultivar parte de una planta (explante) dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial con condiciones físicas y químicas adecuadas. Esta forma de

cultivar y/o propagar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia, y el control de los factores que afectan el crecimiento (Roca, 1997).

De este modo, la técnica de cultivo in vitro no solamente es una herramienta para la investigación en biología y fisiología vegetal, sino también, un medio de multiplicación y propagación de plantas al servicio de los programas de producción vegetal (Berthouly, 1987).

Los objetivos perseguidos con la utilización del cultivo de tejidos in vitro vegetales son numerosos y diferentes. Brevemente, las posibilidades de aplicación de tales cultivos se pueden resumir así:

- a) Estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica y ciencias afines;
- b) Bio conversión y producción de compuestos útiles;
- c) Incremento de la variabilidad genética;
- d) Obtención de plantas libres de patógenos;
- e) Propagación de plantas; y
- f) Conservación e intercambio de germoplasma

## **2.8. MICROPROPAGACIÓN**

La micro propagación es una técnica de propagación vegetativa basada en la capacidad que poseen las células vegetales de dividirse y de regenerar órganos y plantas enteras, cuando son sometidas a condiciones nutritivas y ambientales adecuadas y son estimuladas con determinados reguladores de crecimiento. Las características esenciales del método son:

**2.8.1. Propagación vegetativa:** es decir, sin participación de los órganos reproductores de la planta, por medio de la estimulación de la inducción de yemas axilares que darán lugar a nuevos brotes que, una vez enraizados, formarán las nuevas plantas. Es una propagación masiva, ya que la formación de yemas puede ser estimulada en gran número y en corto espacio de tiempo. Además es una propagación clonal, ya que la formación de yemas axilares asegura la producción de plantas conformadas genéticamente al tipo original (Edwin, 2008).

**2.8.2. Propagación in vitro:** porque tiene lugar en frascos de cultivo, y con medios de cultivo definidos en los que se controla la composición y concentración de sus componentes. Tiene lugar fuera del ambiente natural, en cámaras de cultivo donde son controladas las condiciones ambientales (luz, temperatura, humedad relativa) que se mantienen a unos niveles óptimos para el crecimiento.

Se mantienen las condiciones asépticas en todas las manipulaciones, evitando las contaminaciones por hongos o bacterias que proliferarían con rapidez en el medio de cultivo afectando negativamente al cultivo de tejidos. Para ello es esencial la esterilización del material vegetal y de los frascos y medios de cultivo.

Entre las ventajas que se pueden obtener de la propagación vegetativa se encuentran las siguientes.

- Los cultivos son iniciados con un pequeño explante para que luego vayan creciendo mediante brotes. Por ello, solo se requiere un pequeño espacio para mantener las plantas e incrementarlas a un gran número mediante dichos brotes.
- Se pueden utilizar medios de cultivo que contengan antibióticos y de esta manera evitar la contaminación del medio y del explante.
- Se puede regular la influencia de ciertos factores mediante un ajuste flexible de nutrientes y el nivel de reguladores de crecimiento, luz y temperatura. Por lo tanto así se logra obtener una tasa de propagación alta, lo cual es muy beneficioso cuando se necesitan altos volúmenes de producción.
- Es posible producir clones de algunos tipos de plantas que son lentas y difíciles de propagar vegetativamente.
- La producción puede ser continua e independiente de las estaciones del año.
- El gasto de energía y espacio es menor para propósitos de propagación masiva y mantenimiento de plantas madre. Sin embargo, la propagación vegetativa también presenta algunas desventajas como son las siguientes:
- La producción de plantas mediante medios especializados resultan caros.
- Las plantas derivadas de cultivo de tejidos, inicialmente no son capaces de producir sus propios nutrientes, y es necesario aclimatarlas por cierto periodo de tiempo antes que puedan sobrevivir por sí mismas.
- Debido a que in vitro están en un ambiente con una humedad relativa alta, cuando salen hacia ambientes externos para aclimatarse, pueden tener grandes pérdidas de agua lo cual puede ser perjudicial para su crecimiento (Edwin, 2008).

### **2.8.3. Cultivo de segmentos nodales**

El explante más usado en los procesos de micro propagación in vitro son las yemas vegetativas de las plantas. En los nudos o segmentos caulinares hay tejidos de crecimiento laterales que pueden ser estimulados para que desarrollen nuevos vástagos, es decir al realizar este tipo de cultivo se aísla una yema junto con una porción de tallo, para que posteriormente la acción de citoquininas

frene la dominancia apical e induzca la formación de yemas axilares, cuando se produce un número suficiente de yemas, pueden ser enraizados, y las plántulas obtenidas trasladadas al suelo (Pierik, 1990).

Pero no solo hay que tener en cuenta estos factores sino también la ubicación de la yema en el brote puesto que de esto también dependerá obtener in vitro los mejores vástagos.

Este método es el más utilizado en la propagación comercial, debido a la estabilidad genética de las plantas obtenidas y a la facilidad con que se ha establecido en una gran variedad de especies herbáceas y leñosas. Su principal desventaja radica en la laboriosidad del proceso, lo cual implica altos costos por mano de obra, bajos coeficientes de multiplicación en comparación con otros sistemas de regeneración y escasa posibilidad de automatización del proceso productivo (Roca, 1997).

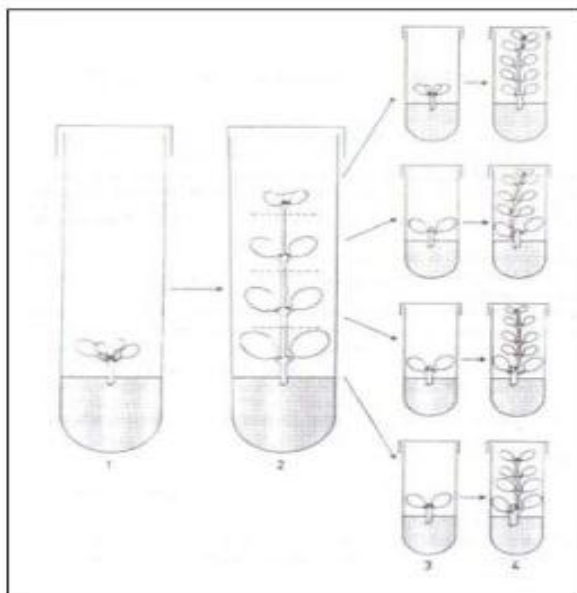


Gráfico 1. Representación esquemática del método de explantes nodales, para la propagación vegetativa de plantas (Pierik, 1990)

## **2.9. Consideraciones sobre la micro propagación**

### **2.9.1. Los explantes**

Para empezar, es muy importante la elección de los explantes, los cuales son partes de la planta madre, que pueden ser pequeños órganos o tejidos de la planta entera. Teóricamente, células

vegetales, órganos, o plantas pueden ser clonados y obtener una población donde todas individualmente tienen la misma constitución génica del progenitor.

El tipo de explante a utilizar depende del tipo de cultivo a iniciarse, el propósito del cultivo y la especie de planta a ser usada. La correcta elección del explante puede tener efectos importantes en el éxito del cultivo de tejidos. Cuando las plantas crecen en un ambiente externo son contaminadas con diferentes microorganismos y plagas. Estos contaminantes son principalmente confinados a las superficies de la planta, aunque algunos microorganismos y virus pueden adentrarse en tejidos (Cassells, 1997). Cuando se realiza el cultivo de tejidos se debe tomar en cuenta esto ya que debido a que el cultivo se inicia como pequeños explantes y deben crecer en medios nutritivos que también son favorables para el crecimiento de microorganismos, este debe realizarse en condiciones totalmente asépticas (Tineo, 2003).

La mayoría de microorganismos, y en particular, bacterias y hongos compiten adversamente con la planta por los nutrientes del cultivo *in vitro*. Por lo tanto, los explantes deben estar libres de microorganismos cuando son colocados en el medio nutritivo. Esto usualmente involucra tener plantas madre que crezcan dentro de un vivero que minimice al máximo la posibilidad de infección, tratando a las plantas con desinfectantes químicos, y además esterilizar los materiales que se utilizarán en la siembra de los explantes *in vitro*. Estos cultivos se realizan sembrando los explantes en envases esterilizados los cuales contienen el medio de cultivo estéril. Sin embargo, el crecimiento de estos explantes puede fallar, o morir, debido a contaminación microbiana; para asegurar la supervivencia de un adecuado número de plantas, es necesario iniciar numerosos cultivos al mismo tiempo utilizando el mismo órgano o tejido de la planta (Roca, 1997).

Los explantes tomados de plantas madre a diferentes periodos del año pueden no dar resultados reproducibles. Esto se debe a la variación del nivel de contaminantes externos en la planta, o debido a los cambios estacionales en los niveles de reguladores endógenos de crecimiento en las plantas madre (Edwin, 2008).

### **2.9.2. Medio de cultivo**

El material vegetal solo crecerá *in vitro* cuando se le provee de un medio nutritivo especializado. Un medio usualmente consiste en una solución de sales suplementado con los macro y micro elementos necesarios para el crecimiento de una planta entera. Los compuestos orgánicos que se incluyen en un medio de cultivo son numerosos y pertenecen a distintos grupos: vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento. Las vitaminas son necesarias *in vitro*, principalmente algunas del grupo B. la tiamina y el myoinositol son esenciales para un crecimiento

normal además se suele añadir piridoxina, ácido nicotínico y un aminoácido, glicina. La sacarosa está presente en gran concentración (30 g/L) porque sirve de fuente de energía y de carbono (Edwin, 2008).

Se han descrito numerosas formulaciones adaptadas para casos concretos, no existiendo un medio único ideal. Las necesidades nutritivas para un crecimiento óptimo in vitro varía con la especie y pueden ser específicos de acuerdo a la parte de la planta o tipo de tejido que se cultiva y a la respuesta que se desea obtener (Sabit, 2006). Sin embargo, el medio de cultivo más utilizado es el descrito por Murashige y Skoog (MS) en 1962 con una concentración relativamente alta de sales que provoca crecimientos rápidos en la mayoría de los cultivos. Sin embargo, se han descrito modificaciones adaptadas para plantas leñosas que mejoran el crecimiento como los descritos por Quoirin y Lepoivre (1977) o el “Woody plant médium” (WPM) por Lloyd y McCown en 1980 (Edwin, 2008).

A continuación se detallarán los principales componentes de los medios de cultivo:

### **2.9.3. Agua**

Es el componente más abundante del medio de cultivo puesto que constituye el 95% del medio sirve como transporte para una mejor absorción de los nutrientes. En la preparación del medio de cultivo se utiliza agua destilada, puesto que el agua potable corriente, además de contener algunos contaminantes, posee una alta concentración de iones de calcio que puede afectar precipitando ciertos componentes del medio de cultivo. Esta agua debe estar almacenada en recipientes plásticos, ya que el vidrio contiene trazas de plomo, sodio y arsénico que pueden pasar al agua (Olmos, 2009).

### **2.9.4. Macronutrientes**

#### **2.9.5. Nitrógeno**

El nitrógeno es esencial en la vida de la planta, pues es parte de las proteínas, los ácidos nucleicos y la clorofila. En la mayoría de las plantas, el nitrato es la única manera de absorber el nitrógeno, y una vez tomado es reducido a amonio para incorporarlo a las moléculas orgánicas.

Tanto el crecimiento como la morfogénesis en cultivo de tejidos están influenciados en gran manera por la disponibilidad de nitrógeno y por la forma en la cual este se presenta. En su mayoría los medios de cultivo proveen el nitrógeno en forma de iones nitrato, ya que el nitrógeno en forma de amonio en altas concentraciones resulta tóxico para la planta (Moriguchi, 1989).

### **2.9.5.1. Fósforo**

El fósforo es un elemento vital en la bioquímica de la planta. Está presente en numerosas macromoléculas tales como ácidos nucleicos, fosfolípidos y coenzimas. Funciona en la vía de transferencia de energía siendo parte de la molécula de ATP (adenosina trifosfato). El fósforo es absorbido en forma de orto fosfato por un proceso activo que requiere un gasto de energía. El fosfato, al contrario del nitrato y el sulfato, este no tiene que estar en forma reducida en las plantas, sino en su forma más oxidada, es decir como orto fosfato ( $\text{PO}_4^-$ ).

Sin embargo, altas concentraciones de fosfato disuelto puede reducir el crecimiento, posiblemente porque el calcio y otros micronutrientes son precipitados de la solución y por lo tanto se reduce su consumo. Pero por otro lado el agotamiento de fosfatos tempranamente durante el cultivo tiene un gran efecto en el pH del medio de cultivo en el cual, los fosfatos resultan su componente buffer (Mitsukawa, 1997).

### **2.9.5.2. Potasio**

El potasio es el catión principal dentro de las plantas alcanzando en el citoplasma y cloroplastos, concentraciones de 100 a 200 mM. El  $\text{K}^+$  no es metabolizado, más bien sirve de balance para las cargas negativas de aniones orgánicos e inorgánicos, así como también contribuye significativamente al potencial osmótico de las células. De esta manera, los iones potasio son transportados rápidamente a través de las membranas celulares cumpliendo sus dos roles principales: regular el pH y el ambiente osmótico de las células. El potasio, calcio, sodio y cloro conservan su carga eléctrica dentro de la planta, a diferencia del amonio, nitratos, sulfatos y fosfatos que son rápidamente incorporados dentro de las moléculas orgánicas. (Jouanneau, 1971).

Muchas proteínas muestran alta especificidad por el potasio, el cual actuando como cofactor, altera su configuración, convirtiéndolas en enzimas activas. Una tasa alta de potasio/calcio es señal característica de un estadio juvenil en plantas leñosas. Una deficiencia de potasio en el medio de cultivo lo lleva a un estado hiperhídrico (Pasqualetto, 1998), y a una disminución en la tasa de absorción de fosfatos (Chin, 1982).

### **2.9.5.3. Sodio**

Los iones sodio ( $\text{Na}^+$ ) en algunos casos no son requeridos para el crecimiento y desarrollo de las plantas, e incluso algunas de ellas lo secretan de sus raíces para mantener internamente una concentración baja. Este elemento puede funcionar como un estabilizador osmótico en plantas halófitas, manteniendo una turgencia suficiente para el crecimiento. Por otro lado el sodio parece



tener un beneficio nutricional en algunas plantas por lo cual es considerado un elemento funcional (Subabarao, 2003).

#### **2.9.5.4. Magnesio**

Es un componente esencial de la molécula de clorofila, siendo el átomo central en la estructura de la porfirina. También es requerido para la actividad de algunas enzimas, especialmente las envueltas en la transferencia de fosfato. La síntesis de ATP requiere de magnesio y además ayuda en la unión de las subunidades ribosomales. (Jouanneau, 1971).

#### **2.9.5.5. Azufre**

Es utilizado por las plantas en forma de sulfato ( $\text{SO}_4^-$ ). Las plantas son relativamente insensibles a concentraciones altas de sulfato, ya que son afectadas únicamente cuando esta concentración es mayor a 50 mM (Mengel, 1982). Aunque el azufre principalmente es absorbido por las plantas en su forma oxidada, es incorporado a los compuestos químicos en su forma reducida  $-\text{SH}$ ,  $-\text{S}$  o grupos  $-\text{S}-\text{S}$ , el azufre es usado por las plantas en la síntesis de lípidos y en la regulación de las estructuras de las proteínas mediante la formación de puentes  $-\text{S}-\text{S}-$ . Este elemento también está presente los sitios activos de algunas enzimas. Por lo tanto, el azufre es un elemento esencial y su deficiencia resulta en una carencia de síntesis de proteínas. Las plantas deficientes de azufre son rígidas, frágiles y de tallo delgado (Reuveny, 1980).

#### **2.9.5.6. Calcio**

Es el principal catión que ayuda al balance de aniones dentro de la planta, pero a diferencia del potasio y el magnesio, no se mueve fácilmente. Debido a su capacidad para vincularse a moléculas biológicas, este elemento está envuelto en las propiedades estructurales y fisiológicas de las membranas y paredes celulares. También actúa como cofactor para algunas enzimas como por ejemplo es la responsable de la hidrólisis del ATP. Los iones  $\text{Ca}^{2+}$  actúan en la morfogénesis ya que se requieren para muchas respuestas inducidas por reguladores de crecimiento, particularmente auxinas y citoquininas (Sauders, 1981).

Una deficiencia de calcio resulta en un pobre crecimiento de raíces y en el ennegrecimiento y rizado de los márgenes de las hojas apicales, a menudo seguido de un cese del crecimiento y muerte de la punta del brote (Jones & Hunt, 1967).

#### **2.9.5.7. Cloro**

El ion cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) es esencial para el crecimiento de la planta. Se sabe que las plantas privadas de cloruro son susceptibles al marchitamiento, puesto que el rol principal del cloruro es mantener la turgencia y el balance por cambios rápidos en el nivel de cationes libres como el potasio, magnesio y sodio (Jonson, *et al.*, 1957).

#### **2.9.6. Micronutrientes**

Las células vegetales son más exigentes de micronutrientes cuando se someten a la morfogénesis. En algunas especies, cuando existe carencia de micronutrientes, empieza a formarse callo, y solo cuando estos son añadidos, se producen brotes adventicios. Por ejemplo, la presencia de hierro es particularmente importante para la aparición de brotes adventicios y la formación de raíces (Legrand, 1975).

Los micronutrientes esenciales son el hierro (Fe), Manganese (Mn), Zinc (Zn), Boro (B), Cobre (Cu), y Molibdeno (Mo), los cuales son componentes de las proteínas de las células vegetales con gran importancia metabólica y fisiológica. Por lo menos cinco de estos elementos son necesarios para la síntesis de clorofila (Sundqvist, *et al.*, 1980).

A continuación se presenta el rol de algunos micronutrientes:

##### **2.9.6.1. Manganese**

Es uno de los micronutrientes más importantes que generalmente en los medios de cultivo se encuentra a una concentración entre 25-150 mM. Tiene propiedades químicas similares a las del magnesio y por lo tanto su rol más importante es ser parte de la estructura de algunas enzimas como las descarboxilasas, deshidrogenasas, quinasas y oxidasas. También es necesario para mantener la ultra estructura del cloroplasto (Hewitt, 1948).

##### **2.9.6.2. Zinc**

Es el componente de más de 300 enzimas como la alcohol-deshidrogenasa, anhidrasa carbónica y la ARN-polimerasa (Clarkson y Hanson, 1980)

Las plantas deficientes en zinc tienen una disminuida síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y clorofila, precisamente debido a que se reduce la actividad enzimática. También se ha relacionado al zinc con el contenido de auxinas en las plantas, debido a que se piensa que el zinc es el

componente de una enzima encargada de la síntesis de triptófano, el aminoácido precursor del ácido indol acético (AIA) (Klein, *et al.*, 1962).

### **2.9.6.3. El Boro**

Está involucrado en el mantenimiento de la estructura y función de la membrana celular, posiblemente debido a que funciona como estabilizante quelante dentro de estas estructuras (Clarkson & Hanson, 1980). También es requerido para el metabolismo de ácidos fenólicos y para la biosíntesis de lignina, síntesis de bases nitrogenadas (uracilo) las cuales se requieren para la síntesis de ARN (Mengel y Kirkby, 1982).

El boro promueve la desaparición de la auxina presente naturalmente debido a que incrementa su translocación. Es por ello que los niveles de AIA aumentan en ausencia de boro, debido a que la hormona es retenida en el lugar que fue sintetizada (Goldbach, H. & Amberger, A., 1986) Esto causa que algunas plantas con deficiencia de boro presenten cambios como por ejemplo el crecimiento de brotes laterales dando lugar a plantas con aspecto arbustivo o de roseta (Li, *et al.*, 2001).

### **2.9.6.4. Hierro**

Este metal sirve dentro de las estructuras de los quelantes como por ejemplo el EDTA. También puede estar unido a ciertos aminoácidos llegando así a tener actividad biológica participando en reacciones de óxido reducción. Es un elemento esencial para la síntesis de clorofila y es parte integral del grupo hemo de las proteínas porfirinas (Cruickshank, *et al.*, 1987).

### **2.9.7. Vitaminas**

Las vitaminas son necesarias para las células vegetales debido a que son intermediarios esenciales o catalizadores del metabolismo, es por esto que favorecen el crecimiento de los tejidos en cultivos in vitro y la falta de alguna de ellas puede ser un factor limitante en el crecimiento y desarrollo de la planta. Las vitaminas más usadas en los medios de cultivo son la tiamina (Vitamina B1), ácido nicotínico (niacina), piridoxina (Vitamina B6), y mioinositol. Estas cuatro vitaminas forman parte de la fórmula del medio Murashige y Skoog (1962), el cual es muy utilizado en diferentes proporciones para el cultivo de tejidos (George, 1984). Existen otras vitaminas utilizadas como antioxidantes, tales como la Vitamina C (ácido ascórbico), Vitamina E que se discutirán más adelante. (Jouanneau, 1971).

### **2.9.8. Fuentes de carbono**

Los carbohidratos juegan un papel muy importante en el cultivo in vitro como fuente de carbono y energía. La sacarosa es generalmente la más utilizada dentro de los medios de cultivo debido a que es la más asimilada por los tejidos vegetales. Sin embargo, la presencia de sacarosa en el medio de cultivo inhibe la producción de clorofila y la fotosíntesis haciendo el crecimiento autótrofo menos factible (Edwin, *et al.*, 2008).

El nivel de sacarosa en el medio puede tener un efecto directo en el tipo de morfogénesis. Así por ejemplo, mientras un nivel de 30 g/L favorece la organogénesis, un nivel más alto favorece la embriogénesis somática, mientras que un nivel más bajo puede llevar a la formación de raíces (Roca, 1997).

### **2.9.9. Reguladores de crecimiento**

Algunos compuestos químicos presentes de manera natural en las plantas cumplen una función regulatoria tanto en el crecimiento como en el desarrollo de la planta. Estos compuestos son activos generalmente a muy bajas concentraciones y son conocidos como hormonas vegetales.

Algunos de estos compuestos pueden ser producidos sintéticamente y tienen una actividad fisiológica similar a los producidos por los tejidos vegetales, por eso se llaman reguladores de crecimiento. Existen muchas clases de sustancias reguladores reconocidos como tales, y han sido clasificadas en 5 grupos: auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico. Las auxinas y las citoquininas son las más importantes en la regulación del crecimiento y morfogénesis de los tejidos y órganos vegetales. (Edwin, *et al.*, 2008)

#### **2.9.9.1. Auxinas**

Dentro del grupo de reguladores de crecimiento son las más conocidas y su nombre viene del griego "auxe" que significa 'crecer' por lo que se les da el nombre de auxinas a un grupo de compuestos que estimulan la elongación. Aunque la auxina se encuentra en toda la planta, las más altas concentraciones se localizan en las regiones meristemáticas en crecimiento activo. Se le encuentra tanto como molécula libre o en formas conjugadas inactivas. Cuando se encuentran conjugadas, la auxina se encuentra metabólicamente unida a otros compuestos de bajo peso molecular. Este proceso parece ser reversible.

La concentración de auxina libre en plantas varía de 1 a 100 mg/kg peso fresco. En contraste, la concentración de auxina conjugada ha sido demostrada en ocasiones que es sustancialmente más elevada (George, 2008).

Una característica sorprendente de la auxina es la fuerte polaridad exhibida en su transporte a través de la planta, el cual requiere de un mecanismo dependiente de energía, alejándose desde el punto apical de la planta hacia su base. Este flujo de auxina reprime el desarrollo de brotes axilares laterales a lo largo del tallo, manteniendo de esta forma la dominancia apical. El movimiento de la auxina fuera de la lámina foliar hacia la base del pecíolo parece también prevenir la abscisión (Roca, 1997).

Este transporte polar de la auxina es fundamental para el establecimiento de la polaridad de la planta y sus órganos. La inhibición del transporte polar de auxinas lleva a muchas anormalidades (Liu. *et al.*, 1993).

Las auxinas tienen funciones regulatorias en algunos procesos fisiológicos *in vitro*, como por ejemplo promover junto con las citoquininas, el crecimiento de callo y la regulación de la dirección de la morfogénesis. A nivel celular, las auxinas controlan procesos básicos como la división y la elongación celular, por lo tanto están involucradas en la formación de meristemas dando lugar a tejidos desorganizados u órganos definidos. En tejidos organizados, las auxinas están implicadas en el establecimiento y el mantenimiento de la polaridad, mientras que en plantas completas su efecto es el de mantener la dominancia apical y la mediación de tropismos (Friml, 2003).

El tipo y concentración de auxina a utilizar depende de algunos factores como:

- El tipo de crecimiento o desarrollo que se quiere tener
- La tasa de consumo y de transporte de la auxina utilizada dentro del tejido en estudio
- La inactivación de la auxina dentro del medio de cultivo (por oxidación o conjugación) o dentro del explante
- El nivel de auxina que sintetiza naturalmente el explante
- La sensibilidad del explante a la auxina
- La interacción entre las auxinas naturales y sintéticas

El modo de acción de las auxinas es mediante una percepción inicial de la señal hormonal, seguida de una cascada de transducción de señal, para finalmente obtener una respuesta fisiológica. De manera parecida a los sistemas animales, las plantas tienen receptores que son capaces de detectar señales hormonales y después iniciar una cadena de eventos moleculares conduciendo a la

respuesta fisiológica final. Existen varios mecanismos de percepción/transducción conocidos en células animales y vegetales aunque no existen evidencias convincentes (Libbenga & Mennes, 1995).

En cuanto a los efectos fisiológicos de las auxinas, en su mayoría se observa una curva en forma de campana cuando se representa la concentración versus su actividad. Es así que a bajas concentraciones (0.1 –10  $\mu\text{M}$ ) el efecto aumenta con la concentración, mientras que a concentraciones más altas que 10  $\mu\text{M}$  se produce un efecto inhibitorio, el cual se debe generalmente a un incremento en la producción de etileno (Edwin, 2008).

A nivel celular, las auxinas tienen un efecto en la elongación celular, generalmente a concentraciones entre un rango de 0.1 a 10  $\mu\text{M}$ , debido a que generan cambios en la expresión génica. Sin embargo, es muy conocido que las auxinas junto con las citoquininas son las responsables de la brotación y el crecimiento, debido a que ambas están envueltas en la división celular. Es así que, mientras las auxinas ejercen un efecto en la replicación del ADN, las citoquininas parecen ejercer control sobre los eventos que conducen a la mitosis (Jouanneau, 1971).

A nivel de tejidos, las auxinas son conocidas por su capacidad para promover la formación de raíces adventicias. Con una baja concentración de auxinas predomina la formación de raíces adventicias, mientras que con altas concentraciones de auxina no se producen raíces, y tiene lugar la formación de callos (Pierik, 1990).

Los efectos de las auxinas en el cultivo de tejidos, como ya se ha dicho anteriormente, depende de la concentración presente de la auxina, así como de otras hormonas. Uno de los efectos es la inducción a callo, ya que alteran la fisiología programada genéticamente de los tejidos de toda la planta. Las células que responden a las auxinas se vuelven a un estado indiferenciado y empiezan a dividirse. La auxina más utilizada en los cultivos para la formación de callo es la 2,4 D, sin embargo, puesto que los cultivos que se mantienen en 2,4 D pueden volverse genéticamente variables, algunos investigadores prefieren utilizar ANA o AIA (Irvine, *et al.*, 1983).

Otro efecto de las auxinas es promover el crecimiento inicial de meristemas. Una baja concentración de auxina es beneficiosa mientras se combine con una alta concentración de citoquininas, si lo que se quiere es llevar a cabo la multiplicación de brotes, aunque en algunos casos es suficiente utilizar solamente citoquininas. Es por esto que se debe escoger cuidadosamente la concentración de auxina que estimule el crecimiento sin inducir la formación de callo (Edwin, 2008).

La formación de raíces usualmente requiere un ajuste en la concentración de auxinas y citoquininas, puesto que generalmente la rizogénesis se lleva a cabo con un tratamiento únicamente a base de auxinas, ya que las citoquininas pueden resultar inhibitorias para este proceso (Reid y Howell, 1995)

Es así que las auxinas son los únicos reguladores de crecimiento que se aplican para estimular el enraizamiento. Entre ellas y las más utilizadas se encuentran el ácido indol-3-butírico (IBA), y el ácido 1-naftalén-acético (ANA) (Nissen y Sutter, 1990).

No se aplican durante toda la fase de enraizamiento ya que puede inducir la formación de callo, sin embargo, se suelen utilizar a concentraciones generalmente entre 2-3 mg/L durante los primeros 4-8 días y luego se los pasa a un medio sin reguladores de crecimiento. La riboflavina es una vitamina que destruye la auxina sólo en presencia de luz, y por lo tanto su adición permite actuar a la auxina en la oscuridad durante el periodo de inducción de enraizamiento, catalizando su fotodegradación posteriormente cuando se expone el cultivo a la luz, e impide que se forme callo (Van der Krienken W. *et al.*, 1992).

#### **2.9.9.2. Citoquininas**

Las citoquininas también son llamadas citocininas porque estimulan la citocinesis o división celular. Entre la variedad de citocininas que se producen naturalmente, la más frecuente es la zeatina, denominada así porque se descubrió en el maíz (*Zea mays*). Son derivados purínicos, en especial derivados de la adenina, se utilizan frecuentemente para estimular el crecimiento y desarrollo. Entre las citoquininas naturales se encuentran la zeatina, la isopentenil-adenina (IPA), la dimetilamino-purina, la dihidroxizeatina, la metilzeatina, etc. Mientras que entre las citoquininas sintéticas se encuentran la kinetina (KIN: 6-furfuril aminopurina) el BAP o BA (N-6-bencilaminopurina o N-6-benciladenina).

Comprenden una clase separada de reguladores de crecimiento. Particularmente estimulan la síntesis de proteínas y participan en el control del ciclo celular. Esto se debe tal vez a que activan la síntesis de ARN, y así estimulan la síntesis de proteínas y la actividad de algunas enzimas (Kulaeva, 1980).

La acción de las citoquininas es dependiente de la luz. Se ha demostrado que en condiciones de oscuridad, el BA inhibe la elongación de brotes, sin embargo cuando se expuso a condiciones de luz, se observó la promoción del crecimiento de brotes axilares (Baraldi *et al.*, 1988).

Las citoquininas, junto con las auxinas, son el grupo de fitohormonas más eficiente para la inducción *in vitro* de la organogénesis adventicia de manera que, el factor crítico para disparar los acontecimientos del desarrollo está representado por la relación citoquininas/auxinas, más que por la cantidad absoluta de cada hormona (Rashotte, *et al.*, 2005).

Las citoquininas se producen en tejidos de crecimiento activo, en particular en las raíces, embriones y frutos. Las citoquininas producidas en la raíz alcanzan los tejidos ascendiendo por la savia del xilema de la planta. Actuando en conjunto con las auxinas, las citoquininas estimulan la división celular e influyen en la vía de la diferenciación. Los efectos de las citoquininas en un cultivo de tejidos proporcionan claves sobre cómo este tipo de hormonas puede funcionar en una planta intacta. Cuando un fragmento de tejido parenquimatoso de un tallo se cultiva en ausencia de citoquininas, las células crecen alcanzando un gran tamaño, pero no se dividen. Las citoquininas solas no producen ningún efecto. La relación entre las citoquininas y las auxinas controlan la diferenciación celular. Cuando las concentraciones de las dos hormonas se encuentran a niveles apropiados, la masa de las células continúa creciendo, pero se conserva un cúmulo de células indiferenciadas denominado callo. Si se aumentan los niveles de citoquininas, las yemas del brote se desarrollan a partir del callo. Si se aumentan los niveles de auxina, se forman las raíces (George, 2008).

Las citoquininas, las auxinas y otros factores interactúan en el control de la dominancia apical, la capacidad de la yema terminal de inhibir el desarrollo de las yemas axilares. Hasta hace poco, la hipótesis más aceptada para explicar la regulación hormonal de la dominancia apical (la hipótesis de inhibición directa) proponía que la auxina y la citoquinina actuaban como antagonistas en la regulación del crecimiento de la yema axilar. De acuerdo con este punto de vista, la auxina transportada hacia abajo desde la yema terminal del brote inhibe de forma directa el crecimiento de las yemas axilares, haciendo que el brote se alargue a expensas de una ramificación lateral. Al mismo tiempo, las citoquininas que entran al brote desde las raíces contrarrestan la acción de la auxina, estimulando el comienzo del crecimiento de las yemas axilares. Por lo tanto, la relación entre auxina y citoquinina es un factor crítico en el control de la inhibición de la yema axilar. Muchas observaciones están de acuerdo con la hipótesis de la inhibición directa. Si la yema terminal, la fuente primaria de auxina, se elimina, la inhibición de los brotes axilares se elimina y la planta toma un aspecto de arbusto. Así también, la aplicación de auxina a la superficie de corte del brote decapitado nuevamente inhibe el crecimiento de las yemas laterales (George, 2008).

Cuando se aplican en el cultivo de tejidos tienen varias funciones:

- Estimular la división celular
- Formación de brotes adventicios



- Proliferación de brotes axilares
- Inhibición de la formación de raíces

Como ya se ha mencionado, en el cultivo de tejidos, las citoquininas son necesarias para la división celular. Son muy efectivas en promover la iniciación de brotes directa o indirectamente, debido a que se necesita una combinación con auxinas. El balance entre dos tipos de reguladores que se requieren para iniciar el crecimiento o la diferenciación en el cultivo de tejidos. Sin embargo no siempre produce los efectos mencionados, ya que puede variar para ciertas especies (George, 2008).

Cuando se requiere mejorar el crecimiento de brotes axilares, y reducir la dominancia apical, deben ser aplicadas uno a varias citoquininas en la fase de multiplicación. Un tratamiento efectivo induce el crecimiento de varios brotes pequeños a partir de cada explante durante un periodo de 4 a 6 semanas. Sin embargo, si los niveles de citoquinina son muy altos, ocasionan la aparición de numerosos brotes pequeños los cuales difícilmente se elongan, o también puede ocasionar que las hojas de algunas especies tengan una forma inusual (George, 2008).

Altas concentraciones de citoquinina (0.5-10 mg/l) generalmente inhiben o retrasan la formación y crecimiento de raíces. Por esta razón, algunos investigadores prefieren evitar el uso de citoquinina en la fase de enraizamiento o incluso en la previa al enraizamiento, de manera que se realizan subcultivos previos en un medio sin hormonas hasta que los niveles de citoquinina dentro de los tejidos hayan reducido lo suficiente (George, 2008).

### **2.9.9.3. Giberelinas**

El ácido giberélico (AG), tras su aislamiento a partir del hongo *Gibberella fujikuroi*, ha sido ampliamente estudiado por sus funciones en el alargamiento celular (Roca K et al., 1993). De este grupo se conocen más de 100 miembros que comparten el anillo gibano y se denomina cada una con un número según el número de carbonos presentes en su estructura. Ninguna planta tiene todas las giberelinas, algunas han sido encontradas únicamente en hongos. Así también, no todas las giberelinas son igualmente activas, algunas son precursoras de otras giberelinas. El AG<sub>1</sub> es la giberelina más activa en cuanto a promover la elongación celular. Sin embargo muy pocas giberelinas están disponibles comercialmente, por lo que una de las más comerciales es el AG<sub>3</sub> (Roca, 1993).

Las giberelinas participan en varias funciones del desarrollo vegetal, además de la elongación celular, participan en la activación de enzimas hidrolíticas como la  $\alpha$ -amilasa y la proteasa en

semillas y cereales, por lo cual facilita la movilización del endosperma. En algunas plantas promueve la germinación de semillas, la floración, así como determina el sexo y el desarrollo de los frutos.

Las giberelinas no son esenciales para inducir el crecimiento y diferenciación de los tejidos vegetales, pero aun así se las utiliza para la elongación de tallos y hojas ya que estimulan la elongación celular. Sin embargo, cuando se añade AG<sub>3</sub> al medio, este puede tener un comportamiento de auxina. Altas concentraciones de AG<sub>3</sub> (1-8 mg/l) induce la formación de callo. (Roca, 1997).

Los efectos en el cultivo de tejidos pueden ser diversos, por ejemplo algunas veces pueden disminuir o prevenir la formación de raíces o brotes adventicios, cuando se lo utiliza en combinación con auxinas y citoquininas (Murashige, 1961), mientras que en algunas plantas, el AG<sub>3</sub> solo, induce la formación de brotes adventicios, ya que puede actuar como un reemplazo de la auxina (Roca, 1997).

En cuanto a la rizogénesis, el AG<sub>3</sub> inhibe la formación de raíces, pues estudios realizados demuestran que la aplicación de “relativamente altas concentraciones (1-10 mg/l) a la base del explante, previene la formación de raíces, especialmente si se aplican auxinas al mismo tiempo” (Brian, 1959). Por otro lado, cuando el AG<sub>3</sub> es aplicado en bajas concentraciones, puede promover la formación de raíces, esto se debe a que las giberelinas causan que la hoja incremente la producción de auxinas, las cuales son transportadas a la base del peciolo y pueden estimular la inducción a la formación de raíces debido a que incrementan la biosíntesis de auxina natural. En algunas plantas puede realizarse un pre-tratamiento con AG<sub>3</sub> y en ausencia de auxina y de luz. Cuando estas son luego colocadas en un medio inductor, se ha visto un mejoramiento en la formación de raíces (Pierik, R. 1990). Sin embargo esto también puede causar una inhibición, ya que con la aplicación de AG<sub>3</sub> se incrementa la concentración de auxinas, y para algunas especies un nivel alto de esta hormona puede resultar perjudicial si lo que se desea es la formación de raíces (Olmos, 2009).

#### **2.9.9.4. Etileno y Ácido abscísico**

El etileno es una hormona gaseosa, esta se produce tanto en el cultivo de órganos como en el de callos, también puede ocurrir una acumulación de este gas dentro de los recipientes y en especial los de plásticos, esto produce por ejemplo en ápices de vástagos de clavel una inhibición del crecimiento; pero no existe uniformidad de criterios con respecto al papel desempeñado por el

etileno en la organogénesis *in vitro*, algunas referencias nos indican que el etileno no ejerce ninguna influencia en la organogénesis en cambio otras indican un efecto positivo (Pierik, 1990).

En cultivos de callos de tabaco a la luz se demostró que la producción de etileno es mayor cuando se forman vástagos adventicios. El etileno también puede influir en la embriogénesis y formación de órganos en gimnospermas, por ejemplo en cotiledones excisos de *Pinus radiata*, durante la primera semana de cultivo mostraron un incremento de la concentración de etileno y CO<sub>2</sub> en los matraces, induciendo la formación de vástagos adventicios, a diferencia cuando estos gases fueron retirados del matraz el crecimiento se inhibió (Pierik, 1990).

El ácido abscísico (ABA) es un compuesto que existe naturalmente en las plantas. Es un sesquiterpenoide (15 carbonos) que es parcialmente producido a partir del ácido mevalónico en cloroplastos y otros plastos. Otros proponen una ruta biosintética a partir de la degradación de los carotenoides (40 carbonos). El ácido abscísico se obtiene principalmente de las bases ováricas de los frutos. Las proporciones más elevadas de ABA ocurren durante la época de la caída de los frutos (García, 2004). En la mayoría de los casos el ABA produce un efecto negativo en el cultivo *in vitro* (Pierik, 1990).

Los efectos fisiológicos producidos por el ácido abscísico son: estimular el cierre estomático (el estrés hídrico dispara la síntesis de ABA); inhibe el crecimiento del tallo pero no el de las raíces; en algunos casos puede incluso inducirlo; en las semillas induce la síntesis de proteínas de almacenamiento; inhibe el efecto de las giberelinas de inducir la producción de  $\alpha$ -amilasa; induce y mantiene la latencia; induce la senescencia en hojas; e induce la transcripción génica de inhibidores de proteasas en respuesta a heridas lo que explicaría su aparente papel en la defensa contra patógenos (Roca, 1997).

#### **2.9.9.5. Oligosacarinas y Brasinoesteroides**

En los últimos años se han utilizado los brasinoesteroides (BRs) y las oligosacarinas, otros grupos de reguladores, que al incluirse en los medios de cultivo producen efectos positivos sobre el desarrollo de callos, la morfogénesis, la organogénesis, etc. (Olmos, 2009).

Las oligosacarinas son fragmentos de los polisacáridos de la pared celular, y se descubrió que actúan como mensajeros químicos, con propiedades reguladoras específicas. Las oligosacarinas se desprenden de la pared celular por acción enzimática y actúan en el mecanismo de defensa de las plantas pero también pueden regular la tasa de crecimiento y diferenciación, para producir flores, raíces y yemas vegetativas (Pierik, 1990).

Los brasinoesteroides son derivados esteroidales que tienen un núcleo básico (brasinólido) que se presentan en las plantas y actúan a concentraciones muy bajas; fueron aislados del polen de *Brassica napus*. El brasinólido, el 2-4-epibrasinólido y el homobrasinólido son los brasinoesteroides naturales más empleados. Debido a que se encuentran en muy bajas concentraciones en las plantas, se trabaja en la síntesis de análogos de brasinoesteroides, que aun no teniendo la estructura del brasinólido con sus cuatro zonas o sitios activos puedan tener un efecto positivo sobre la fisiología de la planta (Olmos, 2009).

#### **2.9.9.6. Otros compuestos**

Las poliaminas junto con enzimas asociadas son importantes en el control del crecimiento y desarrollo de las plantas, en especial con la diferenciación celular y el desarrollo durante la embriogénesis. Los niveles endógenos de poliaminas (putresceína y espermidina), se incrementan de forma sustancial durante la embriogénesis en zanahoria. La embriogénesis es inhibida por la adición de inhibidores de poliaminas y se restablece con la putresceína, espermidina y espermina. Las poliaminas, junto con uno de sus precursores, la arginina, y el etileno, juegan un papel interrelacionado en el control de la embriogénesis somática (Pierik, 1990).

Se usan varios compuestos como fuente de nitrógeno y vitaminas. La Caseína Hidrolizada (CH) se la usa en concentraciones de 0,1-1,0 g/L (Pierik, 1990), se la puede aplicar en los casos que se desea aumentar el crecimiento por medio del suministro de una fuente de nitrógeno reducido, el CH digerida enzimáticamente presenta un gran número de aminoácidos y otro gran número de compuestos que no han sido identificados (Roca y Mroginski, 1991).

La peptona es otro compuesto y se lo usa a concentraciones de 0,25-3,0 g/L; la triptona de 0,25-2,0 g/L; el extracto de malta de 0,5-1,0 g/L y la levadura se usa de 0,25-2,0 g/L por la alta cantidad de sus vitaminas (B) (Pierik, 1990).

La levadura y el extracto de malta de cebada también son buenas fuentes de nitrógeno reducido y de precursores potenciales de las adenil-citokininas, e incluso de las mismas adenil-citokininas. En la práctica los diversos tejidos vegetales responden de manera diferente a los varios suplementos o mezclas de compuestos usados en los medios de cultivo (Roca y Mroginski, 1991).

Actualmente ya no se suele usar aminoácidos como fuente de nitrógeno orgánico, ya que una adecuada proporción entre los iones de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  puede garantizar las necesidades de nitrógeno. Antes se añadían aminoácidos o mezclas de ellos, ya que la relación entre los anteriores iones no

era la adecuada. La L-glutamina es el aminoácido más usado como fuente de nitrógeno; también se utiliza la adenina y la aspargina (Pierik, 1990).

Muchos tejidos responden diferentemente a los suplementos de aminoácidos (Roca & Mroginski, 1991). Las mezclas de aminoácidos parecen presentar efectos sinérgicos estimulando fuertemente la proliferación de callos y la organogénesis. Los efectos obtenidos mediante el aporte de aminoácidos parecen muy variables según la especie y el tipo de morfogénesis estudiada. Hasta el momento no es posible establecer una regla general (Olmos, 2009).

El carbón activado se produce por carbonización de la madera, a altas temperaturas, en presencia de vapor, posee una red muy fina de poros, con una gran superficie interna, en la cual pueden ser absorbidas todo tipo de sustancias, este se usa a concentraciones de 0,2-3,0% p/v. El carbón activo adsorbe pigmentos tóxicos, como los productos de la oxidación fenólica, también puede adsorber otros compuestos como reguladores de crecimiento, vitaminas, quelatos de Zn y Fe; crea condiciones para el crecimiento de raíces al oscurecer el medio, también puede promover la embriogénesis somática; estimular el crecimiento y organogénesis de las especies leñosas y estabiliza el pH del medio (Pierik, 1990).

#### **2.9.9.7. Factores ambientales**

Los cultivos de tejidos vegetales deben mantenerse en unas condiciones ambientales apropiadas para su mantenimiento, tratando de reproducir las condiciones naturales más favorables. La luz interesa en distintos aspectos: la intensidad, el fotoperiodo y la calidad espectral. La luz es necesaria, no tanto para la fotosíntesis de los tejidos que, si se produce, es en muy baja proporción, sino para que la foto-morfogénesis tenga lugar y se produzcan brotes de aspecto normal. Los cultivos sometidos a intensidades de luz muy altas o muy bajas no muestran buen crecimiento. Intensidades de 1 a 3 Kilolux (unos  $35 \mu \text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) son suficientes para un desarrollo normal (Roca, 1997).

El fotoperiodo es importante en las especies frutales ya que responden a los cambios de duración del día con el crecimiento o el reposo, así que para el cultivo in vitro es conveniente proporcionar luz durante largos periodos generalmente de 16 horas. Aunque la calidad de la luz puede determinar diferentes respuestas morfo génicas por medio del fitocromo, la experiencia demuestra que la luz de tubos fluorescentes de luz blanca, pobre en longitudes de onda larga, es suficiente para obtener buenos crecimientos. La temperatura se regula en torno a los 22-25°C, pero durante el periodo iluminado, en el interior de los frascos de cultivo es ligeramente superior (2 grados) debido

al efecto invernadero, creando un termo período suave aun manteniendo la temperatura constante en la cámara de cultivo. En el interior de los frascos de cultivo se mantiene una alta humedad relativa, cercana a la saturación, debido a las condiciones de estanqueidad casi total necesarias para mantener la asepsia, y que solo permiten un cierto intercambio gaseoso, creando un ambiente favorable para el crecimiento y la multiplicación de los brotes, aunque después deban sufrir adaptaciones para poder ser trasplantadas al exterior (Edwin, 2008).

#### **2.9.10. Cultivo *in vitro* de leñosas**

Tradicionalmente, las especies forestales fueron propagadas vegetativamente mediante el enraizamiento de estacas, de braquiblastos en coníferas, así como también por injertos. Sin embargo, para la mayoría de los árboles propagados por estacas se observa una rápida pérdida de capacidad de rizogénesis al aumentar la edad de la planta donante de las estacas. Al usar la micropropagación una de sus principales ventajas es la capacidad potencial de desarrollar protocolos de multiplicación optimizados para multiplicar árboles adultos que han demostrado ser fenotípicamente superiores (Marin, 1997).

Existen especie leñosas de interés agrícola en especial las especies frutícolas como la pera, la manzana, el mango, los cítricos y especies leñosas forestales como el eucalipto, coníferas, la teca, balsa, etc., otras como el café, el cacao, productoras de almendras y en general todo este grupo de plantas son de suma importancia desde el punto de vista económico y social a nivel mundial (Batista, 1999).

#### **2.10. Fases de la micropropagación**

Los principios básicos de la técnica de la micropropagación son iguales en los diferentes tipos de plantas, y fueron descritos acertadamente por Murashige (1974) en un esquema, ya clásico, que consta de tres fases diferenciadas, con requerimientos nutritivos, hormonales y ambientales diferentes:

Fase 0: Desinfección

Fase 1: Establecimiento del cultivo

Fase 2: Multiplicación de propágulos

Fase 3: Enraizamiento

Fase 4: Restablecimiento de las plantas a suelo

## 2.11. Establecimiento del cultivo

El inicio del cultivo es una fase muy delicada en la que la porción de tejido vegetal que sirve de inóculo (explante) debe sobrevivir al aislamiento del resto de la planta original y comenzar el crecimiento *in vitro*. El medio de cultivo debe proporcionar al explante todo lo que necesita para vivir y desarrollarse.

Dos factores son particularmente importantes en el establecimiento del cultivo: el explante y la esterilización.

Explante: la elección del tipo de explante puede ser determinante para el éxito del establecimiento del cultivo. En la micropropagación de frutales, los más adecuados son los ápices de tallo y las yemas axilares, en los que los meristemos apicales mantienen las características genéticas de la planta original y son capaces de continuar su crecimiento. Otro aspecto importante es el tamaño, es decir, la cantidad de tejidos que acompañan al meristemo y que juegan un papel nutritivo y de protección a los tejidos meristemáticos. Pero mientras mayor es el explante existen mayores posibilidades de contaminación por bacterias o esporas de hongos existentes en la planta original, aunque también es mayor la probabilidad de supervivencia por lo que hay que tomar una decisión de compromiso. Habitualmente se toman yemas apicales y nudos de ramas con una yema axilar, o yemas aisladas en las que por disección se eliminan las pérulas exteriores y se dejan unos pocos esbozos foliares. En el caso de que el objetivo sea la eliminación de enfermedades virales es necesario reducir el tamaño a 0.1-0.5 mm para asegurarnos de tomar solo tejidos meristemáticos libres de virus, por lo que las dificultades técnicas para la supervivencia del explante aumentan considerablemente (Roca, 1997).

Otro problema en el establecimiento es la oxidación fenólica que algunas plantas, particularmente las especies tropicales, contienen altas concentraciones de sustancias fenólicas que son oxidadas cuando las células son heridas. El tejido aislado luego se torna café o negro y no ocurre el crecimiento. Además, hay que considerar el estado de la planta madre, no sólo de su estado sanitario, sino del grado de desarrollo (juvenil o adulto) y de crecimiento (reposo o crecimiento activo). Es aconsejable partir de plantas pre-acondicionadas, en crecimiento activo bajo condiciones de invernadero o cámara, en las que podamos conocer la historia reciente de la planta y situarla en las mejores condiciones. A este acondicionamiento de las plantas se la ha denominado también fase 0 de la micropropagación (Bridg, 2000).

Esterilización: una vez tomados los explantes y antes de ser introducidos en el medio de cultivo hay que eliminar todas las esporas de hongos y bacterias que tienen en su superficie. El grado de

esterilización necesario dependerá del estado de la planta madre. Si partimos de plantas crecidas en el exterior, la presencia de gérmenes será mayor que si se han cultivado en invernadero, con cuidados como el no mojar la parte aérea al regar y con tratamientos fitosanitarios adecuados. En cualquier caso, la humedad siempre favorece el desarrollo de hongos que posteriormente afectarán al cultivo (Edwin, 2008).

Un procedimiento habitual para desinfectar el material tomado de las plantas madre consiste en el lavado en agua corriente (3-10 minutos) seguido de inmersión en una solución de hipoclorito cálcico o sódico durante 20-40 min (según el material) con una concentración de cloro activo de 5g/L a la que se añade unas gotas de un agente humectante (Tween 20) para reforzar su acción frente a la capa de ceras y cutícula de la epidermis. El resto de las manipulaciones (los aclarados y la introducción del explante en el medio) han de desarrollarse en la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas. Tras la desinfección con hipoclorito hay que aclarar con abundante agua destilada estéril (3 a 5 baños) para eliminar los restos y evitar que dañen más el explante, retirar las partes dañadas con un bisturí reduciendo el explante al tamaño deseado y por fin introducirlo en un recipiente con medio de cultivo, conservando la polaridad (parte apical hacia arriba), de forma que no quede totalmente cubierto por el medio. A veces es útil sumergir el material en etanol durante 10-30 segundos, antes de la inmersión en hipoclorito, para disolver las ceras cuticulares y permitir la acción posterior del cloro sobre la superficie (Bridg, 2000).

El uso de antibióticos raramente elimina las bacterias, puede detener su crecimiento, siendo más eficaz la mezcla de varios, sin que alcancen concentraciones tóxicas. A pesar de su baja efectividad, el uso de antibióticos está indicado en el caso de: contaminaciones latentes o cuando las bacterias ya ocupaban el interior de la planta madre y no se dispone de otra fuente (Roca, 1993).

## **2.12. Multiplicación de propágulos**

La fase del establecimiento del cultivo termina cuando se logra tener cultivos en crecimiento. Entonces es preciso estimular la inducción de yemas que, al crecer, formen nuevos brotes. Estos brotes (propágulos) pueden ser separados y colocados en frascos con medio de cultivo nuevo en cada subcultivo. Al repetir el proceso indefinidamente se obtiene una rápida multiplicación del número inicial de brotes. Dos aspectos principales afectan a la multiplicación: el tipo de yemas inducidas y los subcultivos. Según la concentración y el tipo de reguladores de crecimiento y el explante utilizado, se puede inducir dos tipos de yemas: axilares, que provienen de meristemas preexistentes derivados del meristemo apical, estables genéticamente, y que conservan la conformidad genética con la planta madre; y adventicias derivadas de tejidos somáticos, principalmente de tejidos desorganizados (callo), y que no son estables genéticamente, pudiendo



obtener aberraciones que den lugar a variabilidad genética, no deseada en la propagación clonal (Roca, 1993).

La formación de yemas adventicias puede aumentar sensiblemente el factor de multiplicación respecto a las axilares, ya que no está limitada a la existencia de un tejido determinado, pero debe evitarse para asegurar la conformidad de las plantas. Regeneradas. Según el hábito de crecimiento *in vitro*, pueden realizarse dos tipos de multiplicación axilar: secciones nodales, es decir, cortando los nudos de los brotes con una yema axilar que dará lugar a un nuevo brote cada uno; o por ramificación axilar mejorada, cuando por la técnica de división y por los reguladores de crecimiento utilizados, se suprime la dominancia apical y se provoca la aparición de numerosos brotes axilares, que pueden ser separados individualmente o por grupos (Bridg, 2000).

Cada cierto tiempo es necesario realizar subcultivos, ya que los brotes crecen y ocupan el espacio del frasco de cultivo, a la vez que agotan los nutrientes del medio y acumulan en sustancias de desecho y exudados que pueden resultar inhibidores o provocar el envejecimiento del cultivo. Para mantener la tasa de crecimiento y multiplicación es necesario pasar los nuevos explantes, separados de sus cultivos, a medio reciente. El periodo de tiempo mínimo entre dos subcultivos (generalmente 1 mes) y el tipo de manipulación realizada en el material en cultivo afectan a los resultados de la multiplicación (Roca, 1993).

### **2.13. Enraizamiento**

La regeneración de raíces adventicias para formar plantas completas es un punto crítico en la propagación vegetativa. El enraizamiento está influido por varios factores como:

Factores genéticos: las especies y variedades que enraízan más fácilmente en el campo también lo hacen *in vitro* (Jarvis, 1986).

Factores fisiológicos: el estado fisiológico en que se encuentra el brote es muy importante. Está influido tanto por el origen del explante como por los subcultivos anteriores. Los explantes tomados de plantas jóvenes enraízan con más facilidad que los tomados de plantas adultas. El enraizamiento mejora al aumentar el número de subcultivos *in vitro*, dado que se produce un presunto rejuvenecimiento, también con la etiolación y con heridas basales. Por otra parte, el enraizamiento es perjudicado por una alteración fisiológica, la vitrificación, en la que los tejidos se vuelven hiperhídricos (Jarvis, 1986).

Factores del medio: la concentración de sales minerales o de algún elemento particular, como el boro, tienen influencia en el enraizamiento. Una concentración de las sales minerales reducida a la mitad o a la cuarta parte suele mejorar el enraizamiento (Jarvis, 1986).

#### **2.14. Restablecimiento de las plantas a suelo**

Una vez obtenidos los brotes necesarios en la fase de multiplicación, debemos prepararlos para el trasplante a suelo y adaptarlos al ambiente exterior. Si los brotes no han alcanzado un tamaño que los haga manejables (unos 2 cm o más) deberá estimularse el crecimiento reduciendo la concentración de citoquinina en el medio. El enraizamiento, puede realizarse in vitro, pasando los brotes individuales a un medio con alta concentración de una auxina (generalmente IBA a 1.3 mg/L) y sin citoquininas, durante un periodo corto de inducción de raíces, para ser pasados luego a otro desarrollo sin reguladores de crecimiento. También es posible realizar el enraizamiento in vivo, fuera de los frascos de cultivo, tratando a los brotes como micro estaquillas y aplicándoles tratamientos de auxinas, bien hundiendo la base en auxina en polvo, bien sumergiéndolas en una solución acuosa (Marín, 1997).

Las ventajas del enraizamiento in vivo son evidentes, ya que se simplifica el método de enraizamiento empleado, las plantas regeneradas deben sufrir un proceso de aclimatación que las adapte al ambiente exterior, con menor humedad relativa, mayor intensidad luminosa y pasando de un modo de nutrición heterótrofo a otro autótrofo. Durante este proceso, las plantas regeneradas son trasplantadas en túneles de plástico para la aclimatación en los que se mantiene una elevada humedad relativa para evitar la desecación, exponiéndolas diariamente a un ambiente con baja humedad relativa durante periodos de tiempo crecientes, permitiendo la recuperación de las plantas y estimulando las adaptaciones fisiológicas y anatómicas necesarias para controlar la pérdida de agua (Marín, 1997).

Las plantas que en los frascos de cultivo adquieren una estructura de plantas de sombra, desarrollan, al ser aclimatadas, adaptaciones a las nuevas condiciones ambientales, con mayor irradiación, menor humedad relativa y un cambio en el modo de nutrición, pasando a ser plantas autótrofas. La pérdida de agua moderada y controlada que sufren durante el proceso de aclimatación estimula el transporte a través de las raíces y del xilema de agua hacia los tejidos foliares, compensando así la pérdida ocasionada, pero también estimula el desarrollo de nuevas hojas, que pueden ser observadas en un corto plazo de una semana. Esta funcionalidad de la nueva planta y de sus órganos, también está confirmada por las observaciones histológicas e histoquímicas. En un plazo de 3-6 semanas las plantas pueden crecer sin protección en un invernadero y posteriormente pasar un vivero (Bridg, 2000).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Características del sitio experimental

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central del Ecuador (FCA-UCE), en el campus Universitario de Quito, cuya ubicación geográfica y características climáticas son las siguientes:

<b>Provincia:</b>	Pichincha
<b>Cantón:</b>	Quito
<b>Parroquia:</b>	Santa Prisca
<b>Altitud:</b>	2 874 m
<b>Latitud:</b>	00° 11' 92'' Sur.
<b>Longitud:</b>	78° 30' 41'' Oeste
<b>Temperatura promedio anual:</b>	17 °C
<b>Humedad relativa:</b>	80%

#### 3.2. Características del cuarto de cultivo

Los tratamientos permanecieron bajo condiciones controladas que se describen a continuación:

<b>Temperatura promedio:</b>	26 °C
<b>Humedad relativa:</b>	60%
<b>Intensidad luminosa:</b>	4 Kilolux
<b>Horas luz:</b>	16 (fotoperíodo)

#### 3.3. Características de la zona de colecta del material vegetal

El Barrio Huaynacuri se encuentra ubicado a 10 minutos del centro de Píllaro es conocido comúnmente por sus pobladores como "HUAYNACURI CUNA DEL DEFENSOR RUMIÑAHUI". Presenta las siguientes coordenadas: Lat: 01° 13' 26'' S Long: 78° 30' 48'' W, a una altitud de 2 850 msnIm y una temperatura promedio 14°C.

El cantón Píllaro con una superficie de 442.8 Km<sup>2</sup> está situado en las faldas de la cordillera central de los Andes, al noreste de la provincia de Tungurahua; se extiende desde el río Guapante o Yanayacu al norte, el Cutzatahua al sur, al oriente de la Cordillera de los Andes y al occidente el

río Culapachán. Se encuentra a una altura de 2.803 msnm, y posee una temperatura promedio anual de 13°C (GADPT, 2013).

### 3.4. Materiales

#### 3.4.1. Material de laboratorio

##### 1. Cristalería

- Botellas de vidrio de 500 ml
- Frascos conserveros de 250 ml
- Matraces (100 ml, 500 ml, 1 000 ml)
- Probetas (10 ml, 25 ml, 50 ml, 500 ml)
- Pipetas graduadas (10, 25, 50, 500, y 1000 ml)
- Vasos de precipitación (500 ml)
- Varilla de agitación
- Cajas de vidrio Petri
- Embudos

##### 2. Reactivos

- Ácido ascórbico
- Ácido cítrico
- Ácido clorhídrico
- Ácido indolbutírico (IBA)
- Ácido giberélico (GA3)
- Ácido naftalenacético (ANA)
- Alcohol potable al 96%
- Alcohol etílico
- Hipoclorito de sodio
- Hidróxido de sodio
- 6- Bencilaminopurina
- Tween 20

##### 3. Equipos y materiales

- Agitador magnético y orbital
- Autoclave horizontal y vertical
- Balanza de precisión
- Bandejas plásticas
- calefactor
- Cámara de flujo laminar
- Cámara fotográfica
- Canastillas plásticas
- Computador
- Cuarto frío
- Destilador de agua
- Estufa
- Espátulas metálicas y plásticas
- Esferográfico
- Fundas de polipropileno
- Fundas ziploc
- Guantes y mascarillas desechables
- Guantes de látex
- Horno de microondas
- Impresora
- Bisturís con su respectivo mango
- Mechero de Bunsen
- Micropipetas (1000ul, 100ul) con sus respectivas puntas
- Papel aluminio
- Pinzas
- Plástico autoadherente (rollopack)
- Piscetas
- Pipetas graduadas (10ml,  $A \pm 0.1$ ml)
- Potenciómetro
- Puntas para micro pipetas
- Probetas
- Servilletas de papel
- Termómetro ambiental
- Tijeras de podar

##### 4. Medios de cultivo

- Murashige & Skooge Modificado (MSM)
- CHU (N6)

### 3.5. Metodología

#### Pre tratamiento a plantas donadoras en campo

Las aplicaciones fitosanitarias se realizaron mensualmente con una rotación de fungicidas y fertilizantes, los cuales fueron:

##### Fungicidas:

Benomil  
Mancoceb  
Score (Difenoconazol)  
Phyton (sulfato de cobre pentahidratado)

##### Fertilizantes:

Kristalon desarrollo  
Urea  
10-30-10

Los explantes utilizados fueron segmentos nodales de manzana Emilia ubicados en huertos frutales mixtos propiedad del Sr Hugo Ruíz en el Barrio Huaynacuri de la parroquia San Miguelito del Cantón Píllaro (Fotografía 2A). Se recolectó muestras de yemas mediante una selección in situ de plantas proveedoras o donadoras de ramas (Fotografía 2B), las cuales poseían las mejores características fenotípicas, como número renuevo de yemas apicales, follaje perenne, denso, plantas vigorosas y visiblemente sanas, libres de bacterias, hongos, ácaros y virus.



Fotografía 2 A) Plantas donadoras. B) Yemas apicales de manzana Emilia

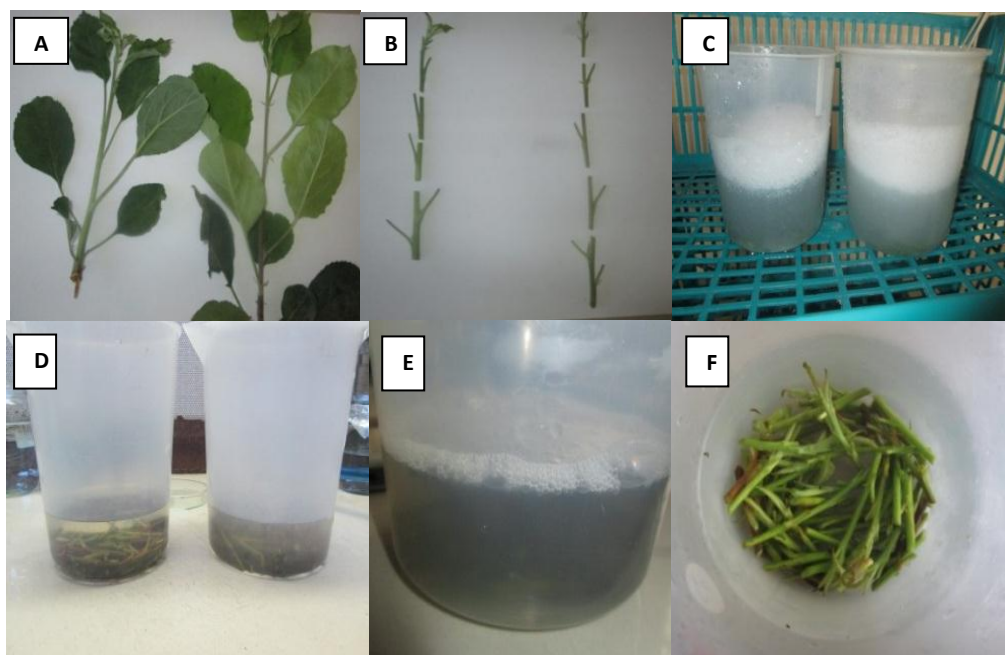
Una vez colectadas las muestras, éstas fueron colocadas en fundas plásticas tipo ziploc, con una pequeña cantidad de agua destilada estéril a fin de evitar la pérdida de humedad y reducir el proceso de deterioro fisiológico del material vegetal, se protegió las bolsas con empaques de cartón a fin de evitar daños mecánicos durante el transporte al laboratorio; en donde se conservaron en cuarto frío (4°C) para impedir la proliferación de microorganismos contaminantes (Vega, 2007).

### 3.6. Fase de establecimiento

#### Pre-tratamiento del material vegetal

Se seleccionó las yemas apicales en mejor estado (Fotografía 3A), a las que se les retiró las hojas y partes dañadas, luego se cortó segmentos de 4-5 cm de longitud (Fotografía 3B), estas yemas se colocó en un vaso de precipitación con agua destilada hasta el tiempo que inicie la fase de desinfección.

Una vez obtenidos los explantes se realizaron dos lavados con agua potable y detergente (2g/500ml), a la solución se añadió Tween 20 (2 gotas/100ml) y se mantuvo en constante agitación durante 10 minutos (Fotografía 3C), posteriormente se realizó tres enjuagues utilizando agua destilada (Fotografía 3D), Después se realizó la inmersión de los explantes en soluciones independientes de Mancozeb (2,5g/500ml) y sulfato de cobre pentahidratado (3ml/500ml de agua) en ambos casos durante 20 minutos en agitación (Fotografía 3E) luego de ello se realizaron tres lavados de dos minutos cada uno utilizando agua destilada (Fotografía 3F).

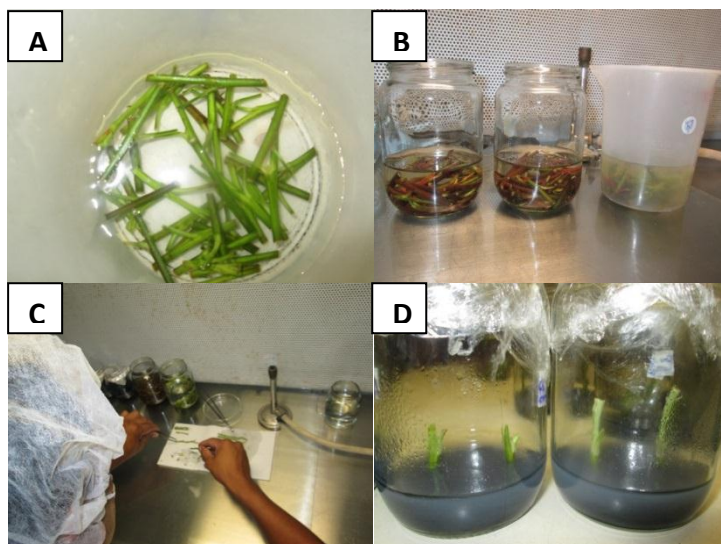


Fotografía 3. Pretratamiento del material vegetal: A) Selección de yemas. B) Formación de segmentos. C) Lavado en detergente. D) Enjuague en agua destilada. E) Tratamiento fungicida. F) Reposo en agua destilada.

### Desinfección de explantes

Para la desinfección de explantes se utilizó como referencia el método utilizado por (Paliz, K. 2012), en la que se realizó modificaciones en el tiempo de inmersión y en la concentración de Hipoclorito de Sodio, evaluando el mejor método de desinfección.

En cámara de flujo laminar se introdujo los explantes en etanol al 70% durante 30 segundos, en seguida se realizó tres enjuagues de 1 minuto cada uno utilizando agua destilada estéril, posteriormente se realizó la sumersión de los explantes en hipoclorito de sodio, probando los diferentes tratamientos de desinfección detallados en el Cuadro 2, luego de ello se realizó tres enjugues con agua destilada estéril de un minuto cada uno, para finalmente sumergir los explantes en una solución de ácido cítrico (0,300 g/L) por el tiempo que dure la siembra.



Fotografía 4. Desinfección del material vegetal: A) Tratamiento en etanol. B) Tratamientos en Hipoclorito de sodio. C) Siembra de explantes. D) Sellado y etiquetado.

### Medios de cultivo

Para esta fase se evaluaron dos medios de cultivo: CHU *et al.*, 1975(N6) para especies de la familia Rosaceae (Anexo 8) y Murashige & Skoog 1962 modificado en base a (Lyndane, 2013) para *Malus spp* en donde se reduce a la mitad la concentración de NO<sub>3</sub>, SO<sub>4</sub>, PO<sub>4</sub> y Cl<sup>-</sup>, se eleva la concentración de myoinositol a 208 mg/L, se suprimen las vitaminas a excepción de la tiamina la cual se eleva a la concentración de 2,5 mg/L (Anexo 7)

En los dos casos se utilizó 30g/L de sacarosa, 6g/L de agar y 1g/L de carbón activado como antioxidante. Los medios de cultivo utilizados se ajustaron a pH  $5.7 \pm 0.02$  usando HCl 0,1M o NaOH 0,1M, y fueron esterilizados en autoclave a 121°C o 15 psi durante 25 minutos, al final se guardaron en el congelador (4°C) hasta su utilización.

Cuadro 2. Tratamientos de desinfección evaluados durante la fase de establecimiento de segmentos nodales de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha. 2014.

Tiempo (min)	Hipoclorito de Sodio (%)		
	5	10	15
10	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3
15	Tratamiento 4	Tratamiento 5	Tratamiento 6

La unidad experimental estuvo constituida por un frasco de 300 ml conteniendo 30 ml de medio de cultivo con dos explantes, en cada tratamiento se generó 15 observaciones, con lo cual se evaluó la contaminación, oxidación y sobrevivencia mediante la prueba de Chi cuadrado utilizando Excel. Las variables a evaluar se describen a continuación:

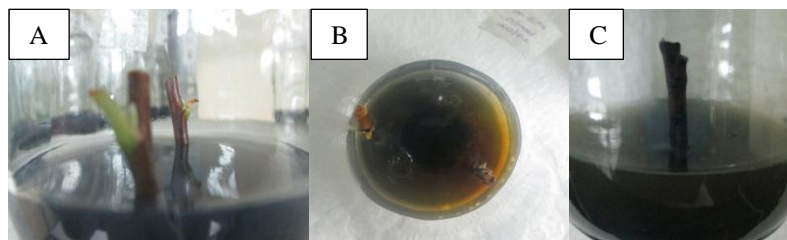
**Contaminación:** Se evaluó la presencia de hongos y bacterias en el medio de cultivo o el explante (Figura 5). Esta variable se evaluó una vez cada semana durante 3 semanas, en donde la presencia de contaminación se calificó con el valor de 1 y su ausencia con 0.



Fotografía 5. Contaminación más frecuente encontrada en los cultivos

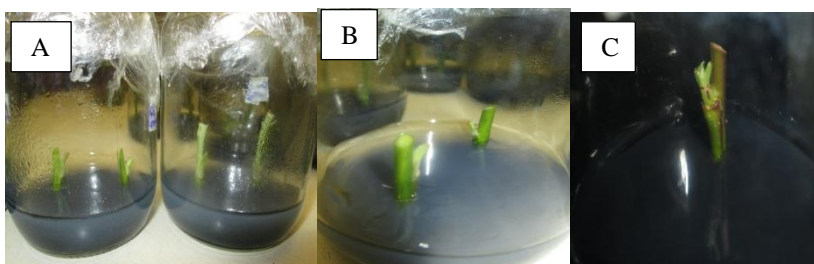


**Oxidación:** Mediante la observación se determinó si un explante presenta oxidación de su tejido, y al cual se le asignó el valor de 0 y por el contrario si éste no presenta oxidación se le asignó el valor de 1.



Fotografía 5. Diferentes niveles de oxidación: A) Tejido sano sin oxidación, B) Tejido oxidado y C) Tejido necrosado (muerto).

**Viabilidad:** Permitió contabilizar el número de explantes viables



Fotografía 6. Viabilidad de explantes: A) 1 días después de la siembra B) 6 días después de la siembra. C) 12 días después de la siembra.

### 3.7. Fase de Brotación

Para esta fase se utilizaron los explantes que lograron establecerse y dentro de la cámara de flujo laminar, en condiciones asépticas, se cortaron los explantes de manera que se dejan libres las yemas para su proliferación. Se utilizó los medios de cultivo de la fase de desinfección, y se evaluó diferentes concentraciones de BAP en los medios de cultivo MS y CHU (N6) para la inducción de brotes, generando 4 tratamientos. (Cuadro 3).

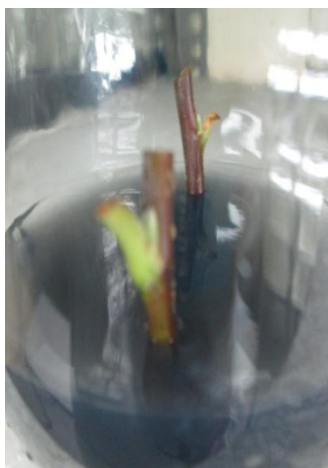
Para determinar el mejor tratamiento se empleó el Diseño de Bloques Completos al Azar con un arreglo factorial 2x4 con 6 observaciones para cada tratamiento, se realizó análisis funcional utilizando la prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS) al 5% para el factor Medios de Cultivo, mientras que para concentraciones de 6-Bencilaminopurina (BAP) se utilizó la prueba de Tukey al 5%; se usó los programas estadísticos: Excel, Infostat y SPSS.

Cuadro 3. Tratamientos utilizados en la fase de multiplicación de brotes de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) Quito, Pichincha.2014

Tratamientos	Codificación	Descripción
t1(Testigo)	m1d0	Murashige & Skoog Modificado 0.0 ppm de BAP
t2	m1d1	Murashige & Skoog Modificado 0.5 ppm de BAP
t3	m1d2	Murashige & Skoog Modificado 1.0 ppm de BAP
t4	m1d3	Murashige & Skoog Modificado 1.5 ppm de BAP
t5(Testigo)	m2d0	CHU (N6) 0.0 ppm de de BAP
t6	m2d1	CHU (N6) 0.5 ppm de de BAP
t7	m2d2	CHU (N6) 1.0 ppm de BAP
t8	m2d3	CHU (N6) 1.5 ppm de de BAP

Las variables evaluadas fueron las siguientes:

**Días a la brotación:** Se evaluó mediante observaciones continuas a los explantes de cada tratamiento, y se determinó el tiempo en el cual aparecerá el primer brote a partir del día que se realizó el repique en el medio de cultivo, el dato se expresó en número de días.



Fotografía 7. Inicio de brotación de yemas axilares.

**Altura del brote:** la longitud del brote se realizó después de 60 días de realizado el repique, se midió desde la base del brote hasta la yema apical y el resultado se expresó en milímetros.



Fotografía 8. Longitud de brotes a los 60 días.

**Número de brotes formados:** se contabilizó la presencia de nuevos brotes que aparecieron en cada uno de los tratamientos, el registro se lo hizo a los 60 días luego del repique



Fotografía 9. Brotes axilares

### 3.8. Fase de enraizamiento

Para esta fase se utilizó la metodología propuesta por Puente y Marin (1992), al cual se lo modificó en las concentraciones de auxinas para determinar el mejor tratamiento de la inducción de raíces.

El procedimiento se llevó a cabo utilizando los brotes elongados provenientes del mejor tratamiento obtenido en la fase II. El medio de cultivo empleado para esta fase fue MSM con 30g/L de sacarosa, 1g/L de carbón activado, 6g/L de agar, una base de 2mg/L de tiamina y con diferentes concentraciones de hormona como se muestra en el Cuadro 3. Este medio se incubó durante 7 días en obscuridad y después se expuso a un fotoperiodo de 8- 16 horas.

Cuadro 4. Tratamientos empleados durante la fase de enraizamiento brotes de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) Quito, Pichincha.2014

Tratamientos	Codificación	Descripción
t1(Testigo)	mli0	Murashige & Skoog Modificado 0.0 ppm de IBA
t2	mli1	Murashige & Skoog Modificado 0.3 ppm de IBA
t3	mli2	Murashige & Skoog Modificado 0.6 ppm de IBA
t4	mli3	Murashige & Skoog Modificado 0.9 ppm de IBA

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Fase de establecimiento

En el proceso de desinfección se evaluó la contaminación, la oxidación y la viabilidad de los explantes, en respuesta a los tratamientos con hipoclorito de sodio en distintas concentraciones y tiempos de inmersión en los medios de cultivo Murashige & Skooge Modificado (MSM) y CHU (N6).

#### 4.1.1. Variable Contaminación

##### 4.1.1.1. Factor medio de cultivo en la concentración de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión.

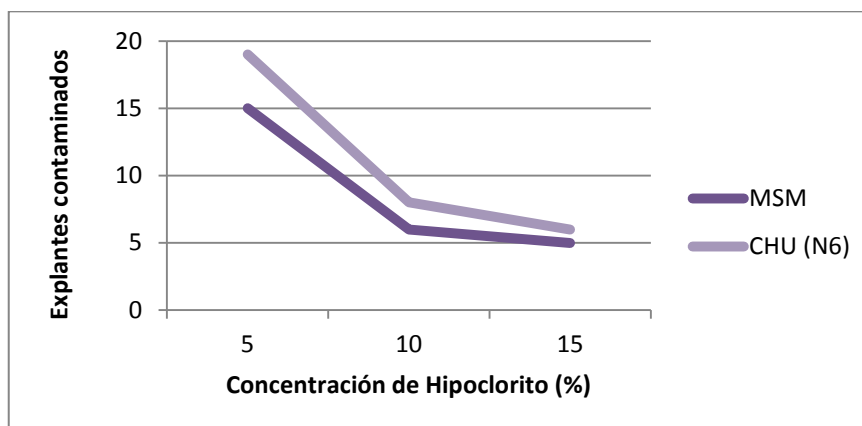
Se evaluó la relación del hipoclorito con respecto a los medios de cultivo mediante una prueba de Chi cuadrado de Pearson cuyo objetivo de esta prueba es comprobar la hipótesis nula mediante el nivel de significación, por lo que si el valor de la significación es mayor o igual que el Alfa ( $\alpha=0.05$ ) se acepta la hipótesis, pero si es menor se rechaza. Para la variable contaminación la ( $H_0$ ) es que haya dependencia de la concentración de hipoclorito de sodio con los medios de cultivo. Para lo cual se realizó el siguiente cuadro:

Cuadro 5. Porcentajes de explantes contaminados de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) para los medios de cultivo CHU (N6) y MSM con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha.2014.

Concentracion de Hipoclorito de sodio (%)	Medios de cultivo			
	MSM		CHU (N6)	
5	15	50%	19	63%
10	6	20%	8	27%
15	5	17%	6	20%
Total	26		33	

Los datos fueron procesados en Excel de donde se obtuvo el valor de Chi cuadrado calculado  $X^2$  de 20,3593 con 5 grados de libertad (g.l.) y el valor de p o de la probabilidad de obtener los datos observados si fuese cierta la hipótesis de independencia fue de 0,00107 el cual es menor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , esto demuestra que existe relación de dependencia entre las concentraciones de hipoclorito y medios de cultivo sobre la contaminación. Además se obtuvo que con la concentración baja de hipoclorito de sodio 5% presentó el porcentaje más alto de

contaminación MSM (50%) y CHU (63%), en cambio con la concentración alta de hipoclorito de sodio (15%) el porcentaje de explantes contaminados fue menor MSM (17%) y CHU (20%) (Gráfica 2).



Gráfica 2. Número de explantes contaminados de manzana Emilia (*Malus comunis*-reineta amarilla de Blenheim) en los medios de cultivo MSM y Chu (N6) con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha.2014.

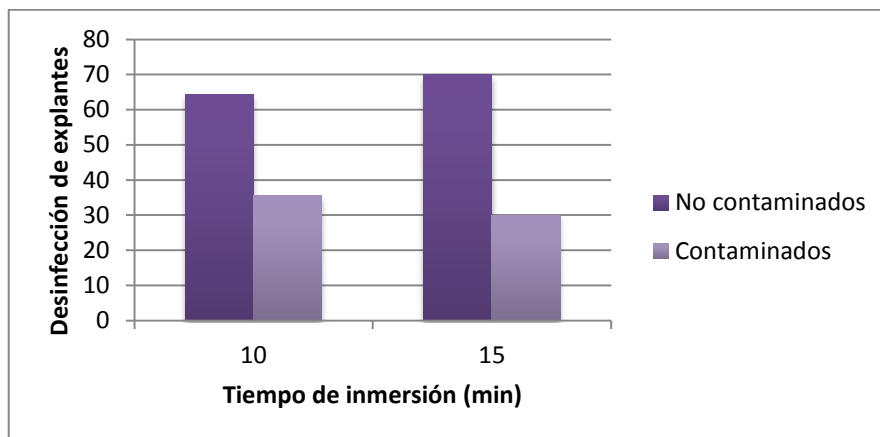
También se evaluó la relación entre del tiempo de inmersión y medios de cultivo, es decir, si la contaminación es independiente del tiempo de inmersión y medios de cultivo, para lo cual se realizó el siguiente cuadro:

Cuadro 6. Porcentajes de explantes contaminados de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) para los medios de cultivo Chu (N6) y MSM con respecto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha.2014.

Tiempo de inmersión (min)	Medios de cultivo			
	MSM		CHU (N6)	
10	14	31%	18	40%
15	12	27%	15	33%
Total	26		33	

Los datos se analizaron en Excel en donde el valor calculado de  $X^2$  fue de 1,6949 con 3 grado de libertad y el valor de p fue 0,6381 el cual es mayor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , esto demuestra que no existe dependencia entre estas variables. Además Los resultados indicaron que el mejor tiempo de inmersión es 15 minutos, debido a que se observó menor contaminación MSM (27%) y CHU (33%). De la misma manera se determina que el medio de cultivo MSM presentó

mejores resultados que el medio de cultivo CHU (N6) para los dos tiempos de inmersión 10 y 15 minutos (Cuadro 6 y Gráfico 3).



Gráfica 3. Porcentaje de explantes contaminados de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) con respecto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha.2014.

Además se analizó la variable contaminación en cada uno de los tratamientos de desinfección evaluados con respecto a los medios de cultivo, para ello se realizó la prueba de Chi cuadrado, en la que el valor calculado de  $X^2$  fue 19,7288 con 11 grados de libertad y un valor de  $p=0,0492$  el cual es menor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , esto demuestra que existe dependencia entre los tratamientos de desinfección y medios de cultivo en la variable contaminación. De esta manera se observa que el tratamiento 6 (15% de NaClO x 15 minutos) presentó el porcentaje más bajo de contaminación MSM (13%) y CHU (20%) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Porcentajes de explantes contaminados de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) para los medios de cultivo CHU (N6) y MSM de acuerdo a cada tratamiento de desinfección. Quito, Pichincha.2014.

Tratamientos	Medios de cultivo			
	MSM		CHU (N6)	
5% de Cl x 10 min	8	53%	11	73%
5% de Cl x 15 min	7	47%	8	53%
10% de Cl x 10 min	3	20%	4	27%
10%de Cl x 15 min	3	20%	4	27%
15% de Cl x 10 min	3	20%	3	20%
15% de Cl x 15 min	2	13%	3	20%

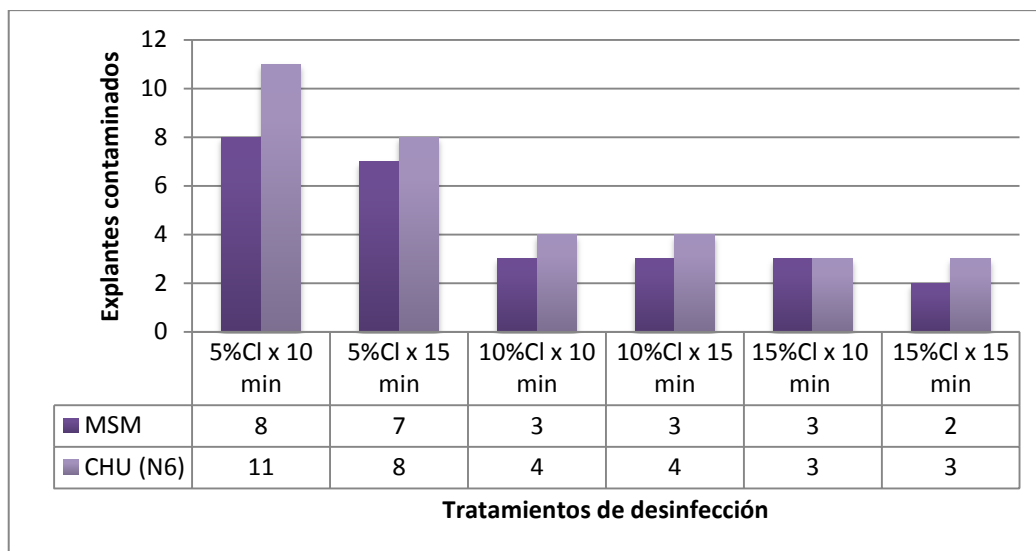


Gráfico 4. Número de explantes contaminados de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) para los medios de cultivo MSM y CHU (N6) de acuerdo a cada tratamiento de desinfección. Quito, Pichincha.2014.

#### 4.1.1.2. Evaluación para la concentración de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión

Se evaluó el efecto del hipoclorito de sodio y su relación con variable contaminación mediante la prueba de Chi cuadrado, es decir si la contaminación es independiente de la concentración de hipoclorito de sodio, para lo cual se realizó el siguiente cuadro:

Cuadro 8. Porcentajes de explantes contaminados de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) para cada nivel de concentración de hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha.2014.

Concentración de Hipoclorito de sodio (%)	Contaminación			
	no contaminados		contaminados	
5	26	43%	34	57%
10	46	77%	14	23%
15	49	82%	11	18%
Total	121		59	

Los datos se analizaron en Excel en donde el valor calculado de  $X^2$  obteniéndose un valor de 50,64 con 5 grados de libertad y el valor p fue de 1,02E-06 el cual es menor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$  por lo tanto se rechaza la hipótesis de independencia, es decir que la contaminación de los explantes depende de la concentración de hipoclorito de sodio, esto se corrobora con lo observado



en el Cuadro 8 y Gráfico 5 en donde se evidencia que a medida que aumenta la concentración de cloro disminuye la contaminación, siendo la concentración de hipoclorito de sodio al 15% la que permite obtener mayor porcentaje de descontaminación (82%).

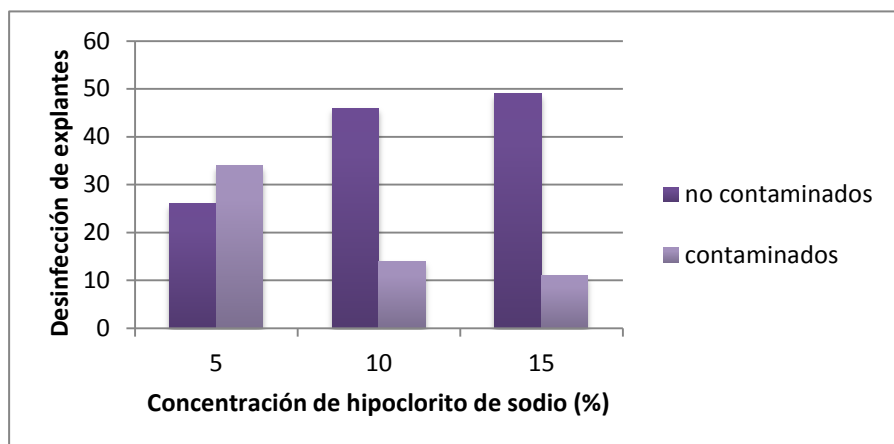


Gráfico 5. Porcentaje de explantes contaminados de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) en las diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha.2014.

También se evaluó el tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio y su relación con el grado de contaminación mediante la prueba de chi cuadrado, es decir, si la contaminación de los explantes es independiente del tiempo de inmersión, para ello se realizó el siguiente cuadro:

Cuadro 9. Porcentajes de explantes contaminados de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) para cada tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha.2014.

Tiempo de inmersión (min)	Contaminación			
	no contaminados		contaminados	
<b>10</b>	58	64%	32	36%
<b>15</b>	63	70%	27	30%
<b>total</b>	121		59	

Los datos se analizaron en Excel en donde el valor calculado de  $X^2$  fue de 29,2148 con 3 grado de libertad y el valor de p fue de 2,01E-6 el cual es menor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , por lo tanto se rechaza la hipótesis de independencia, lo cual indica que la contaminación depende también del tiempo de inmersión, esto se evidencia con los porcentajes relativamente iguales de

descontaminación obtenida en los tiempos de inmersión 10 minutos (64%) y 15 minutos (70%) (Cuadro 9 y Gráfico 6).

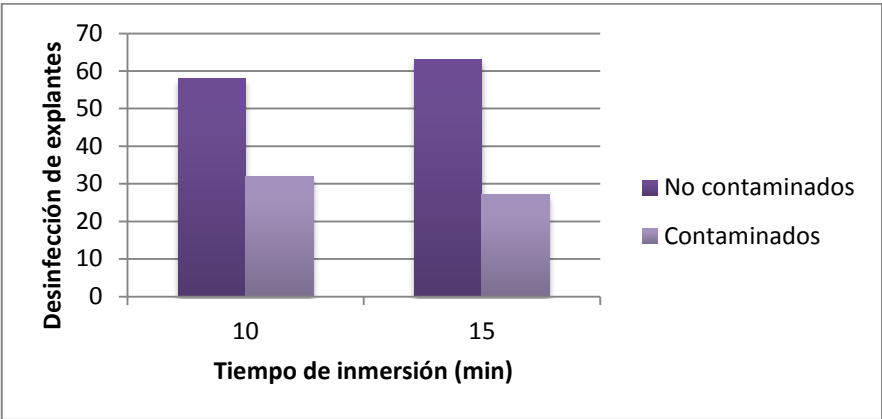


Gráfico 6. Porcentaje de explantes contaminados de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) para cada tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha.2014.

Además se analizó la variable contaminación en cada uno de los tratamientos de desinfección evaluados, para ello se realizó una tabla de contingencia En donde se determinó que la concentración de 15% de NaClO y aplicando un tiempo de inmersión de 15 minutos se pudo obtener el porcentaje más bajo de contaminación (17%), no así con la concentración de 5% de NaClO por 10 minutos que generó el 63% como nivel más alto de contaminación (Gráfico 7).

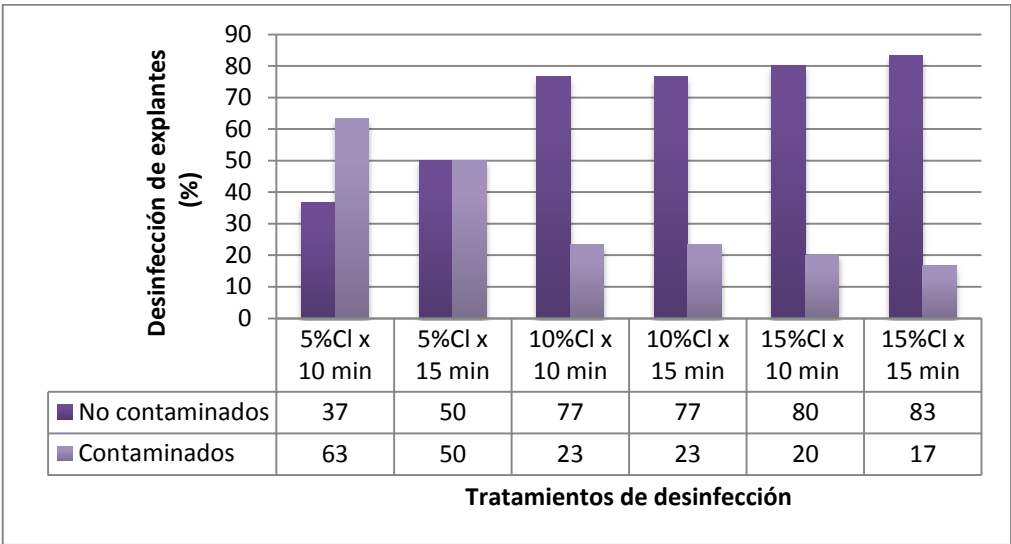


Gráfico 7. Porcentaje de explantes contaminados de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) de acuerdo a cada tratamiento de desinfección. Quito, Pichincha.2014.

Según Muna y colaboradores (1999), considera que la desinfección con hipoclorito de sodio y de calcio no son efectivos en la desinfección de explantes de *Prunus* derivados de árboles adultos crecidos bajo condiciones de campo, comparado con las plantas madre que crecen bajo invernadero. Debido a esto, es que estos investigadores sugieren desinfectar los explantes provenientes de árboles adultos crecidos bajo condiciones de campo con cloruro mercúrico al 0,01% a pesar de ser tóxico para las plantas y para el operador, ya que ha sido determinado por la EPA (Environmental Protection Agency) como un posible carcinógeno.

Otro factor a tomar en cuenta es la pubescencia del tejido. Villalobos y Pérez (1979), expresaron que “si el tejido es pubescente, debe hacerse un prelavado con detergente o etanol 70% durante 30 segundos para romper la tensión superficial y hacer la superficie más accesible a la acción de los agentes desinfectantes”. En esta investigación se tuvo buenos resultados realizando dos prelavados utilizando 3g/l de detergente comercial más la adición de tres gotas de Tween 20 y al final del proceso de lavado se aplicó etanol 70% durante 30 segundos.

Jiménez (1999) y Vega (2006), menciona que los métodos de desinfección utilizados no siempre eliminan las poblaciones de bacterias asociadas a los tejidos de las plantas *in vivo*; muchas son capaces de permanecer latentes en el interior de las células, en los espacios intercelulares o en los haces conductores quedando protegidas, de esta manera, de los agentes químicos. También la contaminación que podría estar relacionada a la presencia de hongos endógenos adquiridos por la planta en su medio ambiente natural, ya que Ramírez y colaboradores (2000), en su estudio “Hongos contaminantes en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Psidium guajava* L.”, indica que los contaminantes pueden estar en la superficie como en el interior del explante, no obstante cuando se encuentran en el interior son más difícil de desinfectar, ya que según Kritzinger y colaboradores 1998 citado por Criollo (2011) los microorganismos endógenos no son eliminados por desinfección superficial, ya que no están expuestos a las sustancias desinfectantes. Esto podría explicar los resultados obtenidos en cuanto a la dificultad de eliminar la contaminación.

Sin embargo en la presente investigación se pudo alcanzar hasta el 83% de descontaminación utilizando explantes de plantas donadoras de campo, contradictorio a lo expuesto por Dal Zotto y Docampo 1997 citados por Cáceres (2009), quienes obtuvieron un porcentaje de contaminación en yemas de Mariana 2624 y Pixy tomadas del exterior mayor al 80%, mientras que el de yemas procedentes de plantas mantenidas en invernadero no superó el 35%.

#### 4.1.2. Variable Oxidación

##### 4.1.2.1. Factor medio de cultivo en la concentración de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión

Se analizó el efecto del hipoclorito de sodio y su relación con los medios de cultivo, mediante la prueba de Chi cuadrado, es decir si el tiempo de inmersión es independiente de los medios de cultivo como indica el cuadro 10.

Cuadro 10. Porcentajes de explantes oxidados de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) en los medios de cultivo MSM y CHU (N6) con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha.2014.

Concentración de Hipoclorito de sodio (%)	Medios de cultivo			
	MSM		CHU (N6)	
<b>5</b>	8	27%	9	30%
<b>10</b>	8	37%	11	37%
<b>15</b>	19	63%	21	70%
<b>Total</b>	35		41	

Los datos se analizaron en Excel en donde el valor calculado de  $X^2$  fue de 16,0421 con 5 grados de libertad y el valor de p fue de 0,006725 el cual es menor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , por lo tanto se rechaza la hipótesis de independencia, cual indica que la oxidación de los explantes depende de la concentración de hipoclorito de sodio y de los medios de cultivo.

También se pudo determinar que la concentración de 5% de hipoclorito de sodio es la que permite obtener menos explantes oxidados MSM 27% y CHU 30%, y además se evidenció el comportamiento de los medios de cultivo frente al fenómeno de oxidación, en donde se tuvo resultados semejantes (Cuadro 10 y Gráfico 8).

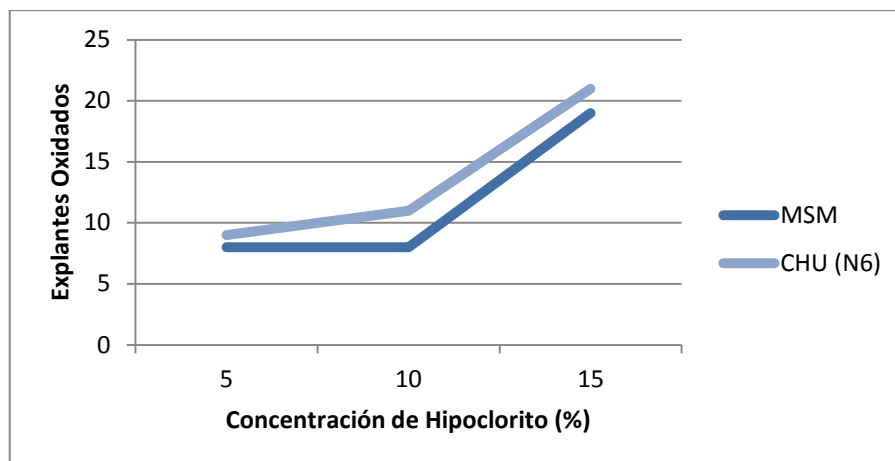


Gráfico 8. Número de explantes oxidados de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) en los medios de cultivo MSM y CHU (N6) con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha.2014.

También se analizó la relación entre oxidación con respecto al tiempo de inmersión y medios, mediante la prueba de chi cuadrado, es decir, si la oxidación de los explantes es independiente al tiempo de inmersión y medios de cultivo, para lo cual se realizó el siguiente cuadro:

Cuadro 11. Porcentajes de explantes oxidados de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) en los medios de cultivo MSM y CHU (N6) con respecto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha.2014.

Tiempo de inmersión (min)	Medios de cultivo			
	MSM		CHU (N6)	
10	16	36%	18	40%
15	19	42%	23	51%
Total	35		41	

Los datos se analizaron en Excel en donde el valor calculado de  $X^2$  fue de 1,8246 con 3 grado de libertad y el valor de p fue de 0,6096 el cual es mayor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$  por lo tanto se acepta la hipótesis de independencia, es decir que el tiempo de inmersión es independiente de los y medios de cultivo para esta variable. Ratificando con los resultados presentados por la Cuadro 11 y Gráfico 9 en donde los porcentajes de explantes oxidados son relativamente iguales para cada tiempo de inmersión, así como también para cada medio de cultivo.

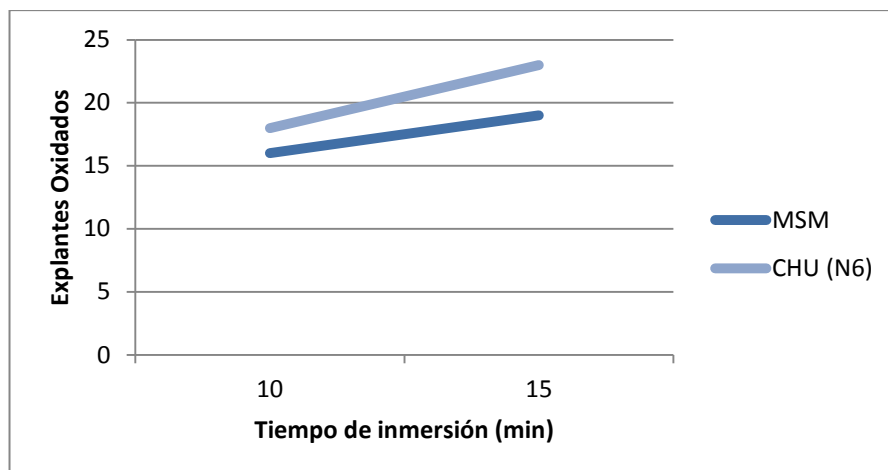


Gráfico 9. Número de explantes oxidados de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) en los medios de cultivo MSM y CHU (N6) con respecto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha.2014.

Además se analizó la variable oxidación en cada uno de los tratamientos de desinfección evaluados con respecto a los medios de cultivo, para ello se realizó la prueba de Chi cuadrado, en la que el valor calculado de  $X^2$  fue 17,6842 con 11 grados de libertad y un valor de  $p=0,0892$  el cual es mayor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , esto demuestra que no existe relación dependencia entre medios de cultivo y tratamientos en la variable oxidación. De esta manera se determinó que el tratamiento t1 (5% de NaClO) aplicando un tiempo de inmersión de 10 minutos se pudo obtener el porcentaje más bajo de oxidación (20%) en ambos medios de cultivo, no así con el tratamiento t6 (15% de NaClO) por 15 minutos que generó el 73% (MSM) y 80% (CHU) como niveles más altos de oxidación (Cuadro 12 y Gráfico 10).

Cuadro 12. Porcentaje de explantes oxidados de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) en los medios de cultivo MSM y CHU (N6) con respecto a cada tratamiento de desinfección. Quito, Pichincha.2014.

Tratamientos	Medios de cultivo			
	MSM		CHU (N6)	
5%Cl x 10 min	3	20%	3	20%
5%Cl x 15 min	5	33%	6	40%
10%Cl x 10 min	5	33%	6	40%
10%Cl x 15 min	3	20%	5	33%
15%Cl x 10 min	8	53%	9	60%
15%Cl x 15 min	11	73%	12	80%

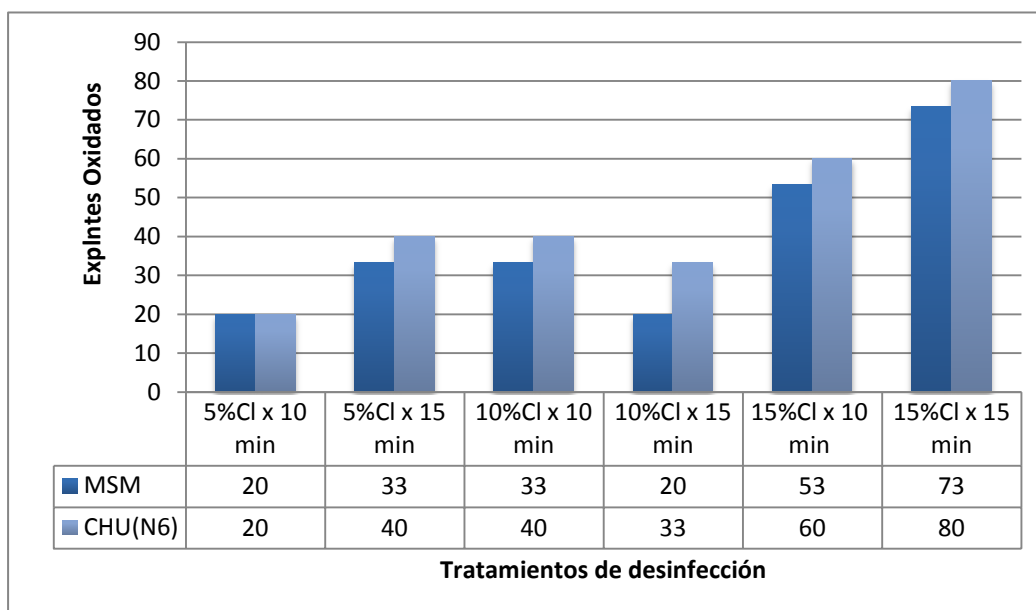


Gráfico 10. Número de explantes oxidados de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) para los medios de cultivo MSM y CHU (N6) con respecto a cada tratamiento de desinfección. Quito, Pichincha.2014.

#### 4.1.2.2. Evaluación por concentración de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión

Se analizó la relación entre el hipoclorito de sodio con respecto a la oxidación mediante la prueba de Chi cuadrado es decir, si la oxidación de los explantes es independiente del tiempo de inmersión, para lo cual se realizó el siguiente cuadro:

Cuadro 13.- Porcentajes de explantes oxidados de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha.2014.

Concentración de Hipoclorito de sodio (%)	Oxidación			
	no oxidados		oxidados	
<b>5</b>	43	72%	17	28%
<b>10</b>	41	68%	19	32%
<b>15</b>	20	33%	40	67%
<b>Total</b>	104		76	

Los datos fueron analizados en Excel en donde el valor calculado de  $X^2$  fue de 31,2 con 5 grados de libertad y el valor de p fue de 8,553E-6 el cual es menor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$  por lo tanto se rechaza la hipótesis de independencia, lo cual indica que la oxidación depende de la concentración de hipoclorito de sodio.

Se evidencia que a medida que aumenta la concentración de hipoclorito de sodio se incrementa la oxidación en los tejidos, siendo el 5% de hipoclorito de sodio la concentración que permitió obtener los porcentajes más altos de explantes libres de oxidación (72%) (Cuadro 13 y Gráfico 11).

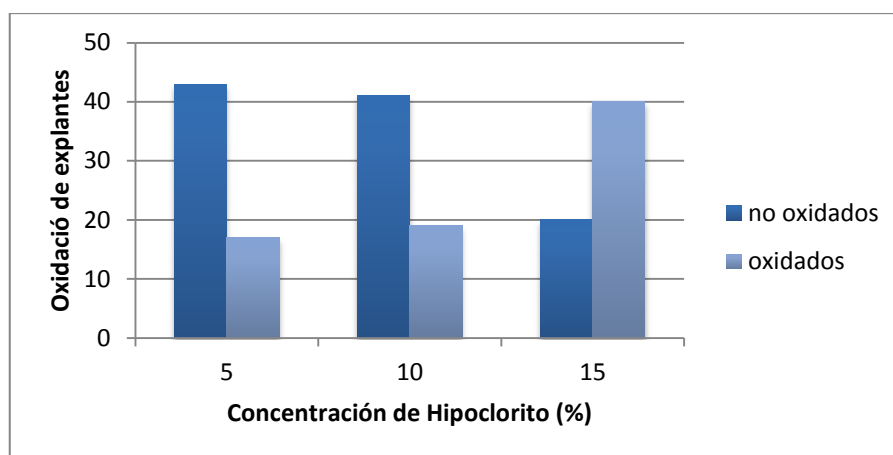


Gráfico 11. Porcentajes de explantes oxidados de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha.2014.

También se analizó la relación entre la oxidación de los explantes con respecto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio mediante la prueba de Chi cuadrado, es decir, si la oxidación es independiente de la concentración de hipoclorito de sodio evaluado, para lo cual se elaboró el siguiente cuadro:

Cuadro 14. Porcentajes de explantes oxidados manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) con respecto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha.2014.

Tiempo de inmersión (min)	Oxidación			
	no oxidados		Oxidados	
10	56	62%	34	38%
15	48	53%	42	47%
Total	104		76	



Los datos fueron analizados en Excel en donde el valor calculado de  $X^2$  fue de 7,7037 con 3 grados de libertad y el valor de p fue de 0,053 el cual es mayor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , por lo tanto se acepta la hipótesis de independencia, es decir que la oxidación de los explantes es independiente del tiempo de inmersión. No obstante el tiempo de inmersión de 10 minutos presentó el porcentaje más bajo (38%) de explantes oxidados, en cambio con el tiempo de inmersión de 15 minutos el porcentaje de oxidación se incrementa a 47% (Cuadro 14 y Gráfico 12).

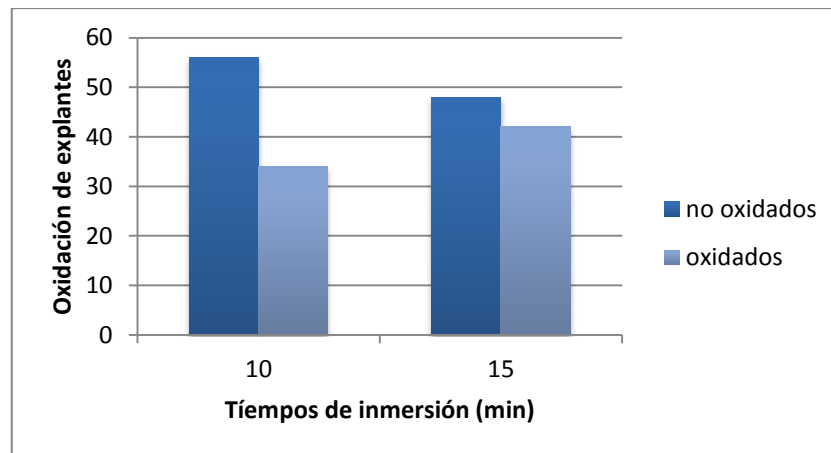


Gráfico 12. Porcentaje de explantes oxidados de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) con respecto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha.2014.

Además se analizó la variable oxidación en cada uno de los tratamientos de desinfección evaluados, para ello se realizó una tabla de contingencia en donde se evidencia que el tratamiento t1 (5% NaClO x 5 minutos) alcanza el mayor porcentaje de explantes libres de oxidación, seguido del tratamiento t4 (10% NaClO x 15 minutos) con 73% (Gráfico 13).

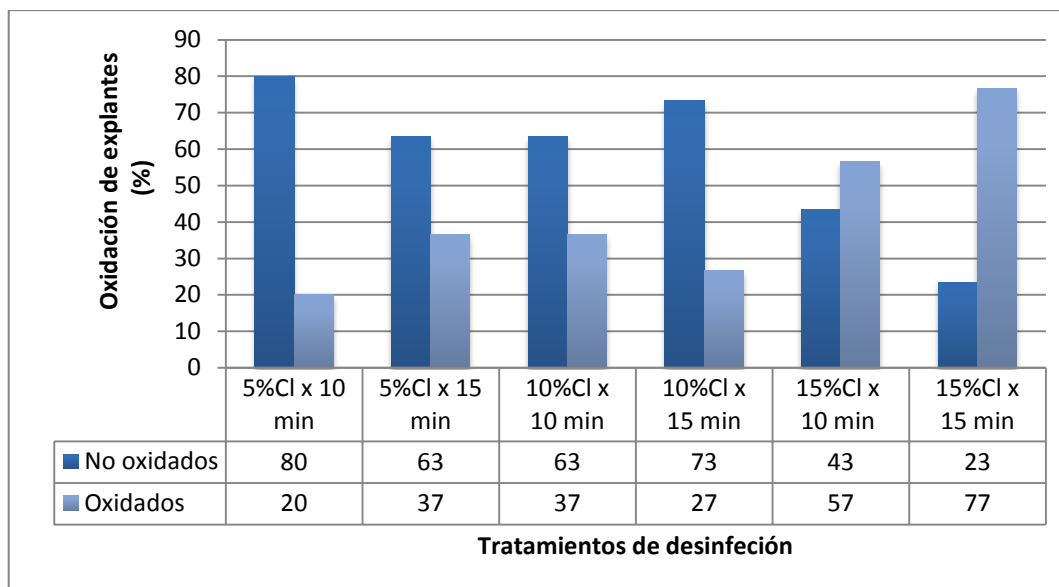


Gráfico 13. Porcentajes de explantes oxidados de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) con respecto a cada tratamiento. Quito, Pichincha.2014.

El cloro actúa como un bactericida muy potente debido a que forma ácido hipocloroso al mezclarse con el agua, y el oxígeno liberado en esta reacción es un agente oxidante muy fuerte y los microorganismos son destruidos ya que puede modificar grupos funcionales, inactivando proteínas enzimáticas. Sin embargo, es un agente altamente oxidante también para el explante, debido a que puede penetrar por las heridas, y a concentraciones altas puede producir un efecto tóxico inclusive puede causar la muerte por necrosis del tejido vegetal (Pierik, 1990). No obstante se tuvo mucha precaución con todas las sustancias involucradas en el proceso de desinfección, puesto que todos los desinfectantes resultan tóxicos para los tejidos vegetales.

Según Preece y Compton 1991 citados por Jiménez (1998), cuando los tejidos son dañados se liberan compuestos fenólicos, que se manifiestan con un ennegrecimiento del medio de cultivo alrededor del explante y que se puede extender a todo el medio, provocar daños al crecimiento y hasta la muerte del explante. Mediante la adición de carbón activo (1 a 3g/L.) al medio de cultivo es posible remover compuestos fenólicos y sustancias inhibitorias o tóxicas del medio de cultivo que son producidas durante el autoclavado, evitando o disminuyendo el deterioro del explante (Roca y Mugrisky, 1999). En-la presente investigación se tuvo buenos resultados adicionando al medio de cultivo 1g/l de carbón activo y 1g/l de polivinilpirrolidona (PVP) resultados que coinciden con lo obtenido por (Paliz, 2012). También se utilizó ácido cítrico (0,300g/L) sumergiendo los explantes al final del proceso de desinfección.

De acuerdo con Dvies y Creasy, citados por George y Sherington (1984), las enzimas involucradas en la biosíntesis y la oxidación de fenoles se incrementan con la luz, por lo que es conveniente mantener los explantes en la oscuridad unos días antes de pasarlos a una intensidad lumínica baja. Marín (1997), manifiesta que el oscurecimiento de los tejidos cultivados in vitro de algunas especies de plantas puede disminuir o evitar aplicando a los explantes una temperatura ligeramente menor a la normalmente empleada, sin que sea lesiva para el explante. En la presente investigación se encontró buenos resultados con 5 días de oscuridad y 17°C en condiciones de laboratorio.

El uso de medios de cultivo con bajo contenido en sales fue muy importante para reducir problemas de oxidación de tejidos, según Cassells (2001), establecen que la oxidación es menor en un medio diluido que en un alto en sales, como es el MS. concorde a esto se obtuvo porcentajes de oxidación reducidos en el medio de cultivo MSM que contiene 2350,22 mg/l de sales, frente a CHU (N6) con 4701,50 mg/L de sales el cual presentó mayor porcentaje de oxidación (Gráfico 10).

Esta modificación del medio, disminuyendo sales, es una forma más efectiva de controlar la oxidación, ya que se disminuye el estrés fisiológico generado por el potencial osmótico y salino. Y de esta forma se previene la estimulación del metabolismo de los compuestos fenólicos y la exudación al medio de cultivo de estos productos (Batista, 1999).

#### 4.1.3. Variable Viabilidad

##### 4.1.3.1. Factor medio de cultivo en la concentración de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión

Se evaluó la relación entre la concentración de hipoclorito de sodio y medios de cultivo mediante la prueba de Chi cuadrado, es decir, si la concentración de hipoclorito de sodio es independiente de los medios de cultivo, para lo cual se realizó el siguiente cuadro:

Cuadro 15. Porcentajes de explantes viables de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) en los medios de cultivo MSM y CHU (N6) con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio Quito, Pichincha.2014.

Concentración de Hipoclorito de sodio (%)	Medios de cultivo			
	MSM		CHU (N6)	
5	13	43%	11	37%
10	22	73%	16	53%
15	10	33%	7	23%
Total	45		34	

Los datos fueron analizados en Excel en donde el valor calculado de  $X^2$  fue de 12,6532 con 5 grados de libertad y el valor de p fue de 0,0268 el cual es menor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , por lo tanto se rechaza la hipótesis de independencia, es decir, existe dependencia entre la concentración de hipoclorito con los medios de cultivo en la variable viabilidad.

Se evidencia que la concentración del 10% de NaClO presenta mayores porcentajes de viabilidad tanto en el medio de cultivo MSM (73%) como en el medio de cultivo CHU (53%), adicionalmente se observa mayor efectividad para obtener explantes viables en el medio de cultivo MSM que en el medio de cultivo CHU(N6) (Cuadro 15 y Gráfico 14).

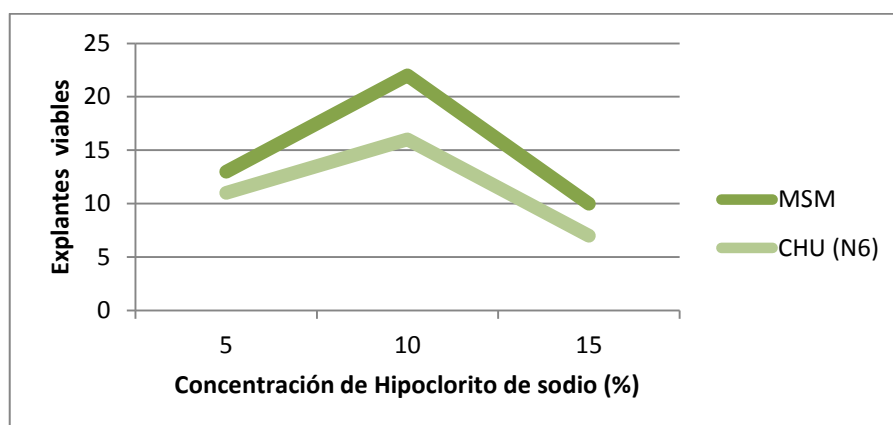


Gráfico 14. Número de explantes viables de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) en los medios de cultivo MSM y CHU (N6) con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha.2014.

También se analizó la relación entre tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio con respecto los medios de cultivo mediante la prueba de Chi cuadrado, es decir, si el tiempo de inmersión es independiente de los medios de cultivo, para lo cual se realizó el siguiente cuadro:

Cuadro 16. Porcentajes de explantes viables de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) en los medios de cultivo MSM y CHU (N6) con respecto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha.2014.

Tiempo de inmersión (min)	Medios de cultivo			
	MSM		CHU (N6)	
10	22	49%	15	33%
15	23	51%	19	42%
Total	45		34	

Los datos fueron analizados en Excel en donde el valor calculado de  $X^2$  fue de 2,616 con 3 grados de libertad y el valor de p fue de 0,4547 el cual es mayor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , por lo tanto se acepta la hipótesis de independencia, es decir que el tiempo de inmersión es independiente de los medios de cultivo.

Se evidencia porcentajes de viabilidad semejantes para los dos tiempos de inmersión, no obstante el medio de cultivo MSM presenta unos mayores porcentajes de viabilidad que el medio de cultivo CHU (N6) (Cuadro 16 y Gráfico 15).

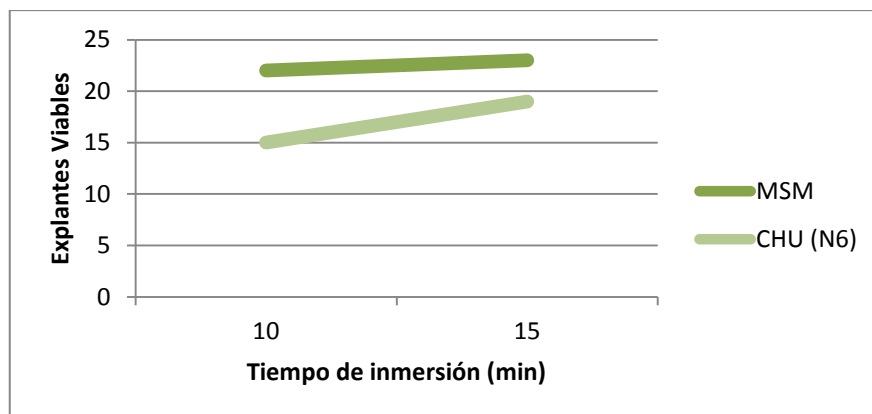


Gráfico 15. Número de explantes viables de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) en los medios de cultivo MSM y CHU (N6) con respecto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha.2014.

Además se analizó la variable viabilidad en cada uno de los tratamientos de desinfección evaluados con respecto a los medios de cultivo, para ello se realizó la prueba de Chi cuadrado, en la que el valor calculado de  $X^2$  fue 16,0598 con 11 grados de libertad y un valor de  $p=0,1389$  el cual es mayor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , esto demuestra que no existe relación dependencia entre medios de cultivo y tratamientos en la variable viabilidad. Pese a ello los resultados indicaron que el tratamiento t4 (10% de NaClO x 15 minutos) permite obtener el porcentaje más alto de viabilidad de 87% en el medio de cultivo MSM y 67% en el medio de cultivo CHU (N6) (Cuadro 17 y Gráfico 16).

Cuadro 17. Porcentajes de explantes de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) viables en los medios de cultivo MSM y CHU (N6) de acuerdo a cada tratamiento de desinfección. Quito, Pichincha.2014.

Tratamientos	Viabilidad			
	MSM		CHU (N6)	
5% de Cl x 10 min	7	47%	4	27%
5% de Cl x 15 min	6	40%	7	47%
10% de Cl x 10 min	9	60%	6	40%
10%de Cl x 15 min	13	87%	10	67%
15% de Cl x 10 min	6	40%	5	33%
15% de Cl x 15 min	4	27%	2	13%

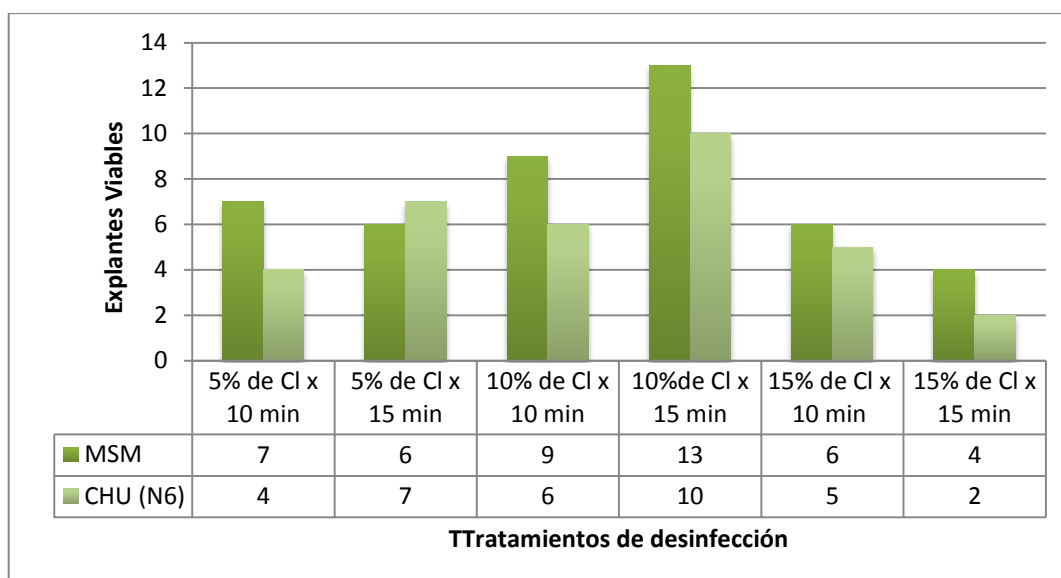


Gráfico 16. Número de explantes viables de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) en los medios de cultivo MSM y CHU (N6) de acuerdo a cada tratamiento de desinfección. Quito, Pichincha.2014.

#### 4.1.3.2. Factor evaluado según concentración de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión

Se analizó la relación entre el hipoclorito de sodio con respecto a la variable viabilidad mediante la prueba de Chi cuadrado, es decir si la viabilidad de los explantes es independiente de la concentración de hipoclorito de sodio, para lo cual se realizó el siguiente cuadro:

Cuadro 18. Porcentajes de explantes viables de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha.2014.

Concentración de Hipoclorito de sodio (%)	Viabilidad			
	no viables		viables	
<b>5</b>	36	60%	24	40%
<b>10</b>	22	37%	38	63%
<b>15</b>	43	72%	17	28%
<b>Total</b>	101		79	

Los datos fueron analizados en Excel en donde el valor calculado de  $X^2$  fue de 21,52 con 5 grados de libertad y el valor de p fue de 0,0006458, el cual es menor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , por lo tanto se rechaza la hipótesis de independencia, lo cual indica que la viabilidad de los explantes depende de la concentración de hipoclorito de sodio.

Por consiguiente se determina que el 10% de hipoclorito de sodio es la concentración que permite obtener un mayor porcentaje de explantes viables (63%) (Cuadro 18 y Gráfico 17).

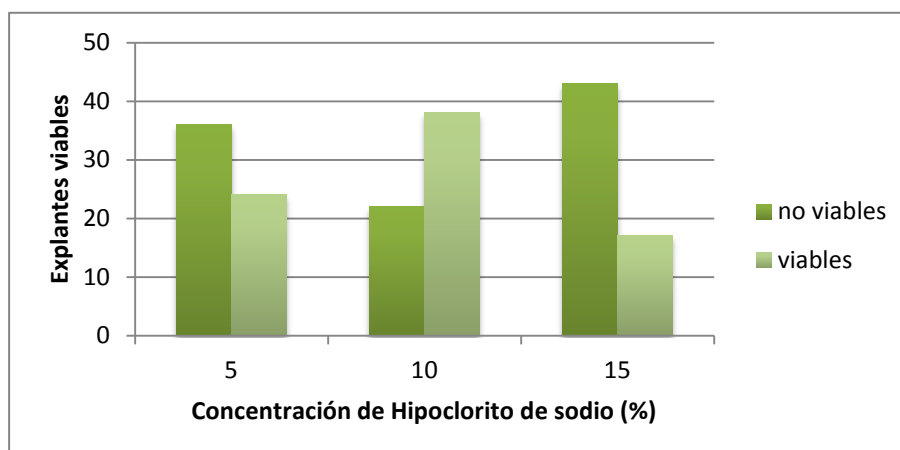


Gráfico 17. Número de explantes viables de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha.2014.

También se evaluó la relación entre tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio con respecto a la viabilidad mediante la prueba de Chi cuadrado, es decir, si la viabilidad de los explantes es independiente del tiempo de inmersión, para lo cual se realizó el siguiente cuadro:

Cuadro 19. Porcentajes de explantes viables de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) con respecto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha.2014.

Tiempo de inmersión (min)	Viabilidad			
	no viables		viables	
<b>10</b>	53	59%	37	41%
<b>15</b>	48	53%	42	47%
<b>Total</b>	101		79	

Los datos fueron analizados en Excel en donde el valor calculado de  $X^2$  fue de 4,3259 con 3 grados de libertad y el valor de p fue de 0,2248 el cual es mayor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , por lo tanto se acepta la hipótesis de independencia, es decir que la viabilidad de los explantes es independiente del tiempo de inmersión.

Se evidencia que el porcentaje de viabilidad es relativamente semejante para los dos tiempos de inmersión 10 minutos (41%) y 15 minutos (47%) (Cuadro 19 y Gráfico 18).

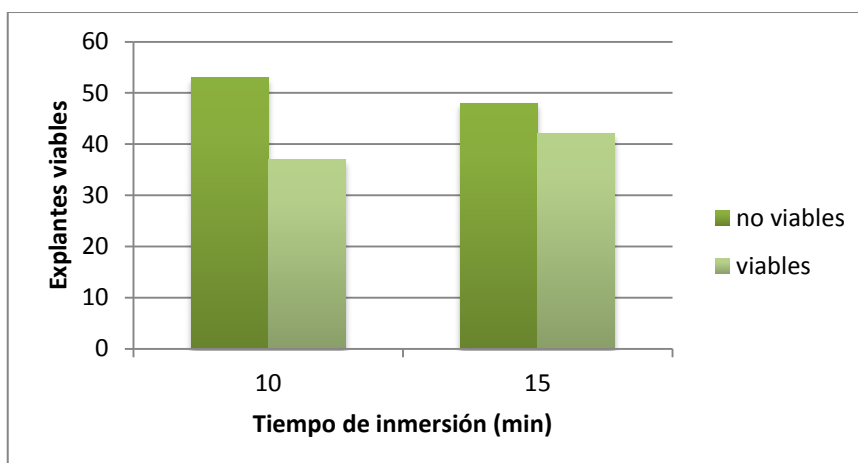


Gráfico18. Número de explantes viables de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) con respecto al tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio. Quito, Pichincha.2014.

Además se analizó la variable viabilidad en cada uno de los tratamientos de desinfección evaluados, para ello se realizó una tabla de contingencia en donde se determina que el tratamiento t4 (10% NaClO x 15 minutos) permite obtener el porcentaje más alto de explantes viables (77%) (Gráfico 19).



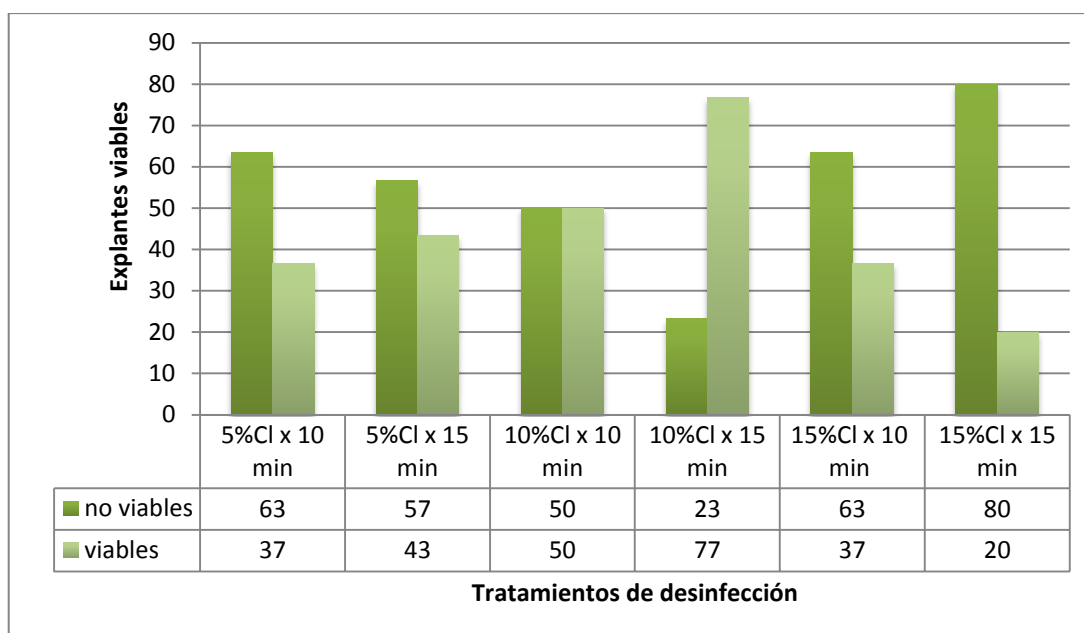


Gráfico 19. Porcentajes de explantes viables de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) con respecto a cada tratamiento de desinfección. Quito, Pichincha.2014.

En esta investigación se constató que la viabilidad de los explantes fue determinada por la concentración de hipoclorito de sodio, de forma que el número de explantes contaminados se reducían proporcionalmente con el aumento de la concentración del cloro, a pesar de que esto resulta favorable también se consideró el número de explantes oxidados los mismos que aumentaban conforme aumentaba también las concentraciones de hipoclorito de sodio evaluadas. De tal manera que el mejor tratamiento no es aquel que menos explantes contaminados presentó, sino aquel que obtiene mayor cantidad de explantes viables (Gráfico 18).

De manera que se eligió a t4 (10%de hipoclorito de sodio por 15 minutos) como el mejor tratamiento en desinfección, puesto que permite obtener un moderado porcentaje de contaminación (23%), oxidación (27%) y el mayor porcentaje de explantes viables (77%); resultados que se acercan efectivamente a lo divulgado por Padilla y Encina (2003), quienes obtuvieron un rango del 70 al 100% de resultados positivos con la desinfección.

Algo que ayudó a incrementar el porcentaje de viabilidad fue el uso de explantes provenientes de plantas donadoras juveniles en crecimiento activo y pre-acondicionadas. Marín (1997), aconseja esto para disminuir pérdidas en la fase de establecimiento para micropropagación de frutales. También se consideró el tamaño del explante, ya que entre más grande sea, mayores son las posibilidades de introducir bacterias o esporas de hongos presentes en la planta original aunque

también es mayor la probabilidad de supervivencia. (Marín, 1997), por lo que se consideró el uso de explantes con un tamaño adecuado de aproximadamente 2 centímetros.

El tiempo de recolección de los explantes influyó notablemente; se observó que durante los periodos de sequía, entre mayo y agosto los explantes recolectados no presentaban mayores problemas en la desinfección, por lo cual su establecimiento fue mucho más fácil que los establecimientos realizados en épocas lluviosas de septiembre a diciembre; mientras que los ensayos realizados con plantas acondicionadas en invernadero demostraron viabilidad en los explantes superior al 80%, siendo más tolerantes a los tratamientos de desinfección utilizados, sin embargo estas plantas no fueron tomadas en cuenta para la investigación, por lo que se enfatizó en fortalecer las cualidades sanitarias a plantas donadoras en campo.

## **4.2. Fase de inducción de brotes**

Para esta etapa se utilizó explantes viables provenientes de la etapa anterior, también se utilizó los mismos medios de cultivo: MSM y CHU (N6) suplementado con 30g/L de sacarosa; 7g/L de agar; 1g/L de carbón activado como agente antioxidante y 1,5mg/L de ácido giberélico (GA3). El factor en estudio fue niveles de 6- benzil aminopurina (BAP) (0, 0.5, 1.0 y 1.5 ppm), y las variables consideradas fueron tiempo a la brotación y número de brotes.

### **4.2.1. Días a la brotación**

En el Análisis de varianza para esta variable cuadro 20, se encontró diferencias altamente significativas para concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP) y para cada uno de los polinomios ortogonales, no hubo significancia estadística para medios de cultivo y para la interacción medios de cultivo por concentraciones de BAP (MXB). El promedio fue 16.12 días a la brotación y el coeficiente de variación fue 11.01% que se considera como muy bueno para este tipo de investigaciones, lo cual valida los resultados que se reportan en esta variable.

De los polinomios ortogonales se destaca la tendencia lineal, puesto que a conforme se incrementa la concentración de BAP aumenta también los días a la brotación y por ende el retardo en la brotación de yemas (Cuadro 20 y Gráfico 20).

Cuadro 20. Análisis de varianza para la variable días a la brotación en la fase de multiplicación de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014.

FUENTES de VARIACIÓN	GL	S C	C M	F cal	F tab	
					5%	1%
TOTAL	47,00	2515,25				
TRATAMIENTOS	7,00	2389,25	341,32	108,36**	2,25	3,12
medios (M)	1,00	0,75	0,75	0,24 <sup>ns</sup>	4,08	7,31
Concentraciones BAP (D)	3,00	2386,25	795,42	252,51**	2,84	4,31
Lineal	1,00	2100,42	2100,42	666,80**	4,08	7,31
Cuadrático	1,00	252,08	252,08	80,03**	4,08	7,31
Cúbico	1,00	33,75	33,75	10,71**	4,08	7,31
MXD	3,00	2,25	0,75	0,24 <sup>ns</sup>	2,84	4,31
ERROR EXPERIMENTAL	40,00	126,00	3,15			
PROMEDIO: 16,12 días a la brotación COEFICIENTE DE VARIACIÓN: 11,01% R <sup>2</sup> : 0,93						

Mediante la prueba de de Kolmogorov-Smirnov (Anexo 1) se comprobó si se cumple el supuesto de normalidad para los residuos necesarios en un diseño experimental paramétrico, en la cual se determinó que la variable en estudio tiene distribución normal ( $p = 0,064$ ). También se comprobó el supuesto de homocedasticidad de varianzas mediante la prueba de Levene (Anexo 2), en la cual se obtuvo que existen diferencias no significativas entre las varianzas de los tratamientos de inducción a brotación ( $p = 0,054$ ).

Cuadro 21. Promedios para el factor medios de cultivo en la evaluación de concentraciones de BAP durante la fase de inducción de brotes de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014.

CODIFICACIÓN	MEDIOS DE CULTIVO	PROMEDIO DIAS A LA BROTACION
m1	Murashige % Skoog Modificado	15,36
m2	CHU (N6)	15,6

En el Cuadro 21, se observa que el medio de cultivo m1 (Murashige & Skoog Modificado) obtuvo la mejor respuesta con un promedio de 15,36 días a la brotación; ya que es un medio de cultivo formulado en necesidades nutritivas específicas de *Mallus spp* (George, 1984).

Cuadro 22. Tukey al 5% para el factor dosis de BAP en la variable días a la brotación durante la fase de multiplicación de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014.

Codificación	Concentraciones de BAP	Promedio días a la brotación (días)
b0	0,0 ppm	9.17 a
b1	0.5 ppm	12.00 b
b2	1,0 ppm	15.67 c
b3	1,5 ppm	27.67 d

Tukey al 5% para el factor concentraciones de BAP (Cuadro 22), generó cuatro rangos de significancia. Encabeza el primer rango con menor número de días a la brotación b0 (0ppm BAP) con un promedio de 9.17 días; mientras que b3 (1.5 ppm BAP) ocupó el último rango con 27.67 días. También el Gráfico 20, evidencia la tendencia lineal positiva en esta variable, ya que a medida que se incrementa la concentración de BAP se incrementa también el número de días para la emisión de brotes. Estos resultados se deben posiblemente a que esta variedad de manzana tiene elevada acumulación de hormonas endógenas, por lo que para esta variable el tratamiento testigo presentó el mejor resultado (Cuadro 22). En conformidad a lo expresado por Simon y Moysett (2004), citados por Jaramillo (2013), quienes manifiestan que las citoquininas *per se* inducen la formación y brotación de yemas adventicias y el desarrollo de yemas axilares, por lo que los requerimientos exógenos de hormonas dependen de los niveles endógenos de cada planta.

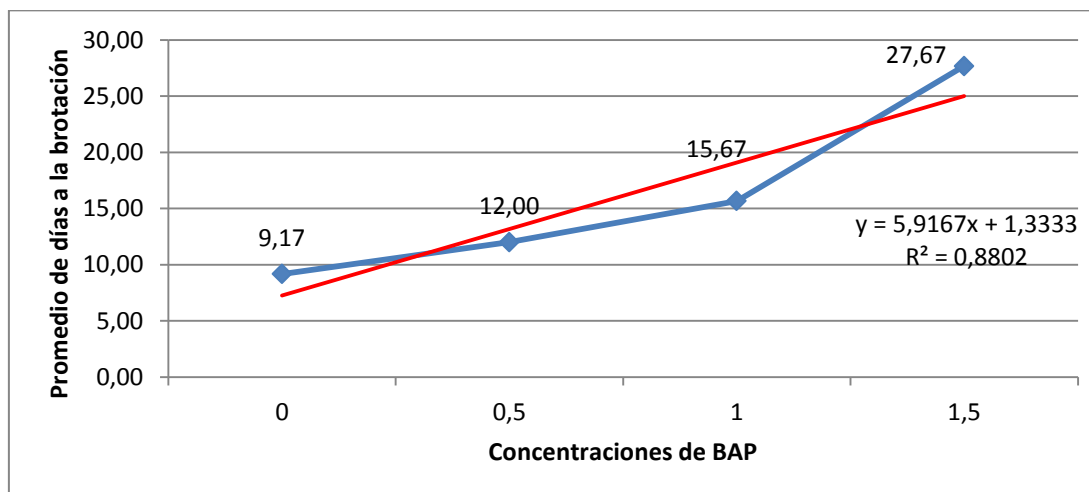


Gráfico 20. Promedio de días a la brotación en la evaluación de cuatro concentraciones de BAP durante la fase de multiplicación de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014.

Cuadro 23. Días a la brotación para la interacción Medios x BAP durante la fase de inducción de brotes de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014.

Codificación	Interacciones MXD	Promedio de días a la brotación (días)
m2d0	CHU + 0 ppm de BAP	9,00
m1d0	MSM + 0 ppm de BAP	9,33
m1d1	MSM + 0,5 ppm de BAP	12,00
m2d1	CHU + 0,5 ppm de BAP	12,00
m1d2	MSM + 1 ppm de BAP	15,33
m2d2	CHU + 1 ppm de BAP	16,00
m1d3	MSM + 1,5 ppm de BAP	27,33
m2d3	CHU + 1,5 ppm de BAP	28,00

En la interacción Medios de cultivo x concentraciones de BAP (Cuadro 23) se observa que el menor tiempo de brotación es 9 días, el mismo que se lo obtuvo con la interacción m2d0 (CHU + 0ppm de BAP), mientras que la interacción m2d3 (CHU + 1.5ppm BAP) presenta mayor tiempo para emitir brotes. Resultados que coinciden con Ordoñez (2013), el cual obtiene buenos resultados con el tratamiento testigo utilizando el medio de cultivo CHU (N6).

#### 4.2.2. Número de brotes

Para el desarrollo de esta variable, el ensayo presentó serias complicaciones debido a contaminación fúngica y bacteriana, además que los brotes establecidos en la fase anterior no respondieron en su totalidad a los tratamientos con BAP, lo que conllevó a obtener una brotación muy limitada e irregular. Pese a ello los resultados obtenidos reflejan una leve respuesta para la concentración de 1ppm de BAP en la que se obtuvo mayor cantidad de brotes vigorosos y mayores en longitud; no así para los tratamientos restantes el cual se observó únicamente la yema original brotada y en el peor de los casos la muerte de los brotes. Resultados que coinciden con el trabajo de Cabrera (2003), en donde obtuvo varios tratamientos *Prunus pérsica* sin respuesta a BAP y por ende tasas de bajas multiplicación.

Ante los problemas suscitados cabe mencionar que la producción de exudados tumorales que deforman las yemas según Taiz y Zeiger (2006), quien sugiere la producción de auxinas endógenas por parte de la plántula, ya que naturalmente las plantas producen auxinas como el AIA, síntesis que ocurre principalmente en tejidos de rápido crecimiento y división como meristemos apicales de tallos. Y para el aspecto de contaminación, se sabe que microorganismos pueden competir ventajosamente con el explante por el medio de cultivo; ya que generalmente su crecimiento es

más rápido y pueden producir metabolitos tóxicos para las plantas, donde finalmente el explante muere (Roca y Mroginski, 1991; Bhojwani y Razdan, 1996).

En el Análisis de Varianza para ésta variable Cuadro 23, se encontró diferencias altamente significativas para concentraciones de 6-bencilamunopurina (BAP) y para cada uno de los polinomios ortogonales. El promedio general fue 2 brotes por explante y el coeficiente de variación fue 30,42% que se considera bueno para este tipo de investigaciones, lo cual valida los resultados que se reportan en esta variable.

De los polinomios ortogonales se destaca la tendencia cuadrática, en donde el efecto de los compuestos hormonales se ve reducido por el exceso en su concentración (Cuadro 24 y Gráfico 21).

Cuadro 24. Análisis de varianza para la variable número de brotes en la fase de multiplicación de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014.

F de V	GL	SC	CM	Fcal	Ftab	
					5%	1%
Total	47,00	17,00				
Tratamiento	7,00	5,67	0,81	2,86*	2,25	3,12
medios (M)	1,00	0,00	0,00	0,00 <sup>ns</sup>	4,08	7,31
Concentraciones BAP (D)	3,00	5,67	1,89	6,67**	2,84	4,31
lineal	1,00	0,27	0,27	0,94 <sup>ns</sup>	4,08	7,31
cuadrático	1,00	3,00	3,00	10,59**	4,08	7,31
cúbico	1,00	2,40	2,40	8,47**	4,08	7,31
MXD	3,00	0,00	0,00	0,00 <sup>ns</sup>	2,84	4,31
Error Experimental	40,00	11,33	0,28			
Promedio: 2 brotes por explante C.V.: 15,42 % R <sup>2</sup> : 0,64						

Mediante la prueba de de Kolmogorov-Smirnov (Anexo 3) se comprobó si se cumple el supuesto de normalidad para los residuos necesarios en un diseño experimental paramétrico, en la cual se determinó que la variable en estudio tiene distribución normal, ( $p= 0,056$ ). También se comprobó el supuesto de homocedasticidad de varianzas mediante la prueba de Levene (Anexo 4), en la cual se obtuvo que existen diferencias no significativas entre las varianzas de los tratamientos de inducción a brotación ( $p = 0,934$ ).

Cuadro 25. Promedios para medios de cultivo en la evaluación de cuatro concentraciones de BAP durante la fase de inducción de brotes de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014.

CODIFICACIÓN	MEDIOS DE CULTIVO	PROMEDIO NÚMERO DE BROTES
m1	Murashige % Skoog Modificado	1,68
m2	CHU (N6)	1,68

En el Cuadro 25 se observa que los dos medios de cultivo presentaron la misma respuesta con un promedio de 1,68 brotes/explante, este resultado se debe posiblemente a que ambos medios de cultivo están formulados para especies leñosas principalmente de la familia *rosaceae* (Marin, 1997).

Cuadro 26. Tukey al 5% para concentración de BAP durante la fase de inducción de brotes de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014.

codificación	dosis de BAP	promedio de número de brotes
b2	1 ppm	2,33 a
b1	0.5 ppm	1,67 b
b0	0,0 ppm	1,50 b
b3	1,5 ppm	1,50 b

Tukey al 5% para el factor concentraciones de BAP (Cuadro 26), generó dos rangos de significancia. Encabeza el primer rango con mayor número de brotes b2 (1ppm BAP) con un promedio de 2.33 brotes; mientras que al final del segundo rango con menor número de brotes se encuentra b3 (1.5 ppm BAP) con 1.50 brotes. De igual manera el gráfico 21 demostró el rango de acción efectiva que va desde 0,8ppm de BAP con un promedio de 1,9 brotes/explante; hasta 1,2ppm de BAP con un promedio de 1,8 brotes/explante. Resultados que coinciden con lo expuesto por BIOPLASMA (1991), en donde obtienen un mayor número de brotes del patrón clonal MM106 empleando 1 ppm de BAP.

Cabe mencionar que el número de brotes está influenciado por la relación auxina:citoquinina, numerosos reportes indican que otros factores están también involucrados en la vía organogénica: ente ellos otros reguladores del crecimiento tales como las giberelinas (que suprimen la iniciación de os brotes o raíces) y el etileno endógeno (que bloquea la iniciación de la organogénesis pero promueve el crecimiento y diferenciación de los primordios de yemas o raíces preexistentes) (Rivero, 2011).

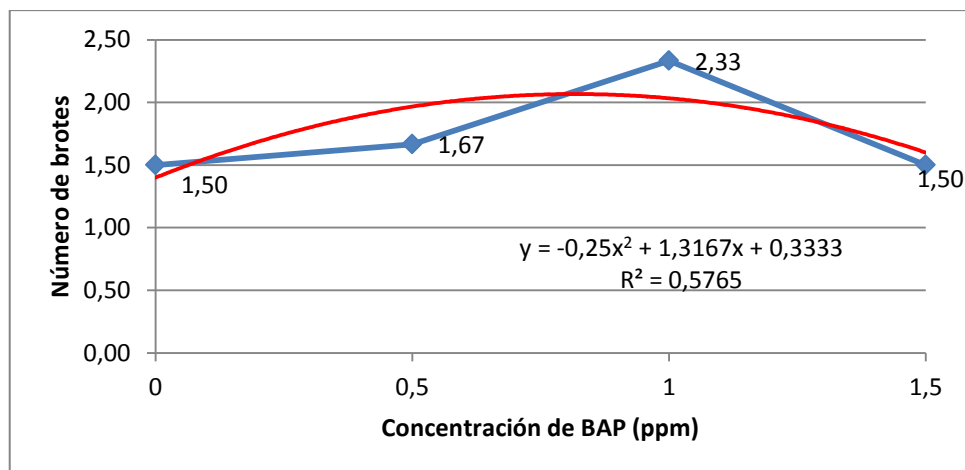


Gráfico 21. Promedio de número de brotes en la evaluación de cuatro concentración de BAP durante la fase de multiplicación de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014.

Cuadro 27. Número de brotes para la interacción Medios x BAP durante la fase de multiplicación de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014.

codificación	interacciones MXD	promedio de número de brotes
m1d2	MSM + 1 ppm de BAP	2,33
m2d2	CHU + 1 ppm de BAP	2,33
m2d1	CHU + 0,5 ppm de BAP	1,67
m1d1	MSM + 0,5 ppm de BAP	1,67
m1d0	MSM + 0 ppm de BAP	1,50
m2d0	CHU + 0 ppm de BAP	1,50
m2d3	CHU + 1,5 ppm de BAP	1,50
m1d3	MSM + 1,5 ppm de BAP	1,50

Para la interacción MxB Cuadro 27 se obtuvo buenos resultados con m1d2 (MSM + 1 ppm de BAP) y con m2d2 (CHU + 1 ppm de BAP) con un promedio de 2.33 brotes/explante. Resultados considerados aceptables si comparamos el índice de multiplicación por yemas axilares para otros cultivares de manzano que está en 1:3 como es el caso del patrón clonal MM 106 (BIOPLASMA, 2001).

La baja proliferación de brotes en los nueve tratamientos de multiplicación probablemente es una respuesta a los niveles endógenos de reguladores de crecimiento que tiene la planta, como también al tiempo necesario que esta especie requiere para alcanzar gran número de brotes, Martínez y Pacheco, 2006), reafirmando que cada especie, incluso del mismo género, responde de manera diferente a los reguladores de crecimiento suministrados.



Si bien esta etapa de multiplicación su objetivo es aumentar el número de plantas en cada repique por medio de los brotes obtenidos (Olmos, 2010). Un gran número de brotes no es aconsejable, ya que la masividad va en detrimento de la calidad, pues se ve que éstos se necrosan y etiolan por la competencia por la luz el oxígeno y los nutrientes (Rodríguez, y Rivera, 2003).

#### 4.2.3. Longitud del brote

En el análisis de varianza Cuadro 28, se obtuvo diferencias altamente significativas para medios de cultivo y concentraciones de BAP. El promedio real fue 3,13cm de longitud/brote y el coeficiente de variación fue de 10,06% que se considera como bueno para este tipo de investigaciones. De los polinomios ortogonales se destaca la tendencia cuadrática, en donde las concentraciones intermedias de BAP proporcionan mayor longitud de los brotes (Cuadro 28 y Gráfico 22).

Cuadro 28. Análisis de varianza para la variable longitud de brotes en la fase de multiplicación de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014.

F de V	GL	SC	CM	Fcal	Ftab	
					5%	1%
Total	47,00	13,14				
Tratamiento	7,00	11,86	1,69	53,35	2,25	3,12
medios (M)	1,00	0,11	0,11	3,60 <sup>ns</sup>	4,08	7,31
Concentraciones BAP (D)	3,00	11,71	3,90	122,83**	2,84	4,31
lineal	1,00	1,57	1,57	49,45**	4,08	7,31
cuadrático	1,00	6,92	6,92	217,90**	4,08	7,31
cúbico	1,00	3,21	3,21	101,13**	4,08	7,31
MXD	3,00	0,04	0,01	0,45 <sup>ns</sup>	2,84	4,31
Error Experimental	40,00	1,27	0,03			
Promedio: 3,13 cm C.V.: 10,06% R <sup>2</sup> : 0,89						

Se utilizó  $\sqrt{\phantom{x}}$  para la transformación de datos y mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Anexo 5) se comprobó si se cumple el supuesto de normalidad para los residuos necesarios en un diseño experimental paramétrico, en la cual se determinó que la variable en estudio tiene distribución normal, ( $p = 0,94$ ). También se comprobó el supuesto de homocedasticidad de varianzas mediante la prueba de Levene (Anexo 6), en la cual se obtuvo que existen diferencias no significativas entre las varianzas de los tratamientos de inducción a brotación ( $p = 0,78$ ).

Cuadro 29. Promedios de longitud de brotes en la evaluación de cuatro concentraciones de BAP durante la fase de inducción de brotes de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014.

<b>CODIFICACIÓN</b>	<b>MEDIOS DE CULTIVO</b>	<b>PROMEDIO LONGITUD DE BROTES (cm)</b>
m2	CHU (N6)	3,03
m1	Murashige % Skoog Modificad	2,72

En el cuadro 29 se observa que el medio de cultivo m2 (CHU) obtuvo la mejor respuesta con un promedio de 3,03cm de longitud, estos resultados son aceptables debido que el medio de cultivo CHU contiene mayor cantidad de elementos nutritivos que el MSM (Anexos 1 y 2) principalmente el nitrógeno el cual se encuentra en forma de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{KNO}_3$  el cual las planta en crecimiento activo necesita grandes cantidades (Olmos, 2013).

Estos resultados que coinciden con Jiménez y Mendoza (1998), quienes mencionan que los explantes jóvenes de especies leñosas a menudo secretan al medio de cultivo poli fenoles oxidados, visibles como pigmentos marrones y/o negros. Dichas sustancias intervienen en la absorción de los nutrientes presentes en el medio de cultivo, por lo que las plántulas no se desarrollan correctamente.

Cuadro 30. Tukey al 5% para dosis de BAP durante la fase de inducción de brotes de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014.

<b>Codificación</b>	<b>Dosis de BAP</b>	<b>Promedio longitud de brotes (cm)</b>
b2	1 ppm	5,85 a
b1	0,5 ppm	3,55 b
b0	0.0 ppm	3,06 b
b3	1,5 ppm	1,07 c

Tukey al 5% para el factor concentraciones de BAP (Cuadro 30), generó tres rangos de significancia. Encabeza el primer rango con mayor longitud de brotes b2 (1ppm de BAP) con un promedio de 5,85 cm de longitud; en tanto que en último rango se ubica b3 (1,5pp de BAP) con 1,07 cm de longitud. Resultados que coinciden con el proyecto de micro propagación del porta injerto de manzano M9 Jork (J9) propuesto por Puente y Marín (1993), en donde obtienen mayor longitud de brotes empleando 1 ppm de BAP.

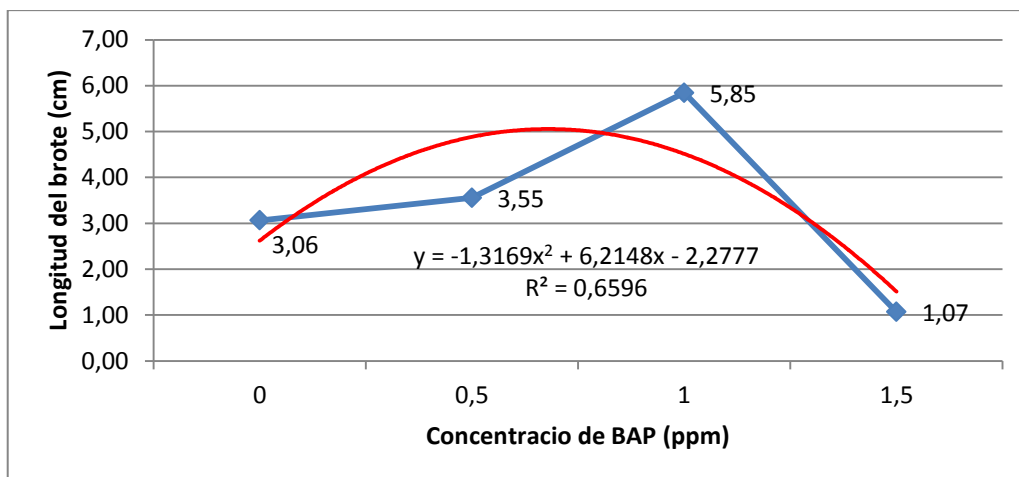


Grafico 22. Promedio de longitud de brotes en la evaluación de cuatro concentración de BAP durante la fase de multiplicación de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014.

Cuadro 31. Promedio de longitud de brotes para la interacción Medios x BAP durante la fase de multiplicación de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014.

codificación	interacciones MXD	promedio longitud de brotes (cm)
m2d2	CHU + 1 ppm de BAP	6,20
m1d2	MSM + 1 ppm de BAP	5,51
m2d1	CHU + 0,5 ppm de BAP	3,79
m1d1	MSM + 0,5 ppm de BAP	3,33
m1d0	MSM + 0 ppm de BAP	2,84
m2d0	CHU + 0 ppm de BAP	3,29
m1d3	MSM + 1,5 ppm de BAP	1,07
m2d3	CHU + 1,5 ppm de BAP	1,06

El cuadro 31 permitió determinar el efecto de los medios de cultivo frente a las concentraciones de 6-bencilaminopurina (MxD), en donde se obtuvo como mejor respuesta a m2d2 (CHU + 1 ppm de BAP) con un promedio de 6,20 cm.

Hurtado y Merino (1998), mencionan que la razón de esta superioridad en la longitud con respecto a los otros medios de cultivo, se explica en la definición de regulador de crecimiento vegetal, que define a los compuestos orgánicos, distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas.

### 4.3. Iniciación de la fase de enraizamiento

La aplicación de auxinas para el enraizamiento in vitro de frutales se realizaba tradicionalmente en un medio de cultivo, del que luego había que cambiar las micro estaquillas a otro sin hormonas, para permitir la elongación de las raíces y evitar la formación de callo (James & Thurbon, 1979; Snir & Erez, 1990 citados por Puente & Marin, 1999), para ello Van Der Krieken y colaboradores (1992), recomienda la utilización de un medio con auxina y riboflavina, que se guarda en oscuridad durante unos días, de forma que la auxina actúe. Luego se expone a la luz y la riboflavina acelera la fotodegradación de la auxina sobrante y se destruye a sí misma, esto evita la transferencia de los brotes en condiciones asépticas y ahorrar un medio de cultivo.

Zimmerman (1994), recomienda de 4 a 7 días en oscuridad, ya que sin permanencia en oscuridad el enraizamiento es nulo. El medio de cultivo con riboflavina necesita de oscuridad, ya que la exposición a la luz supone su rápida degradación, se puede deducir que una semana es aproximadamente el tiempo que necesita la fase de inducción, que precisa un nivel alto de auxinas, con tiempos menores la auxina no ha inducido todos los meristemoides posibles; con tiempos mayores se inhibe la elongación de algunos de ellos. Además la oscuridad tiene siempre un efecto positivo ya que favorece primero un incremento y luego un descenso de la actividad peroxidasa (Druart, *et al.*, 1992), dando un pico que debe permitir la destrucción de la auxina sobrante después de la inducción de las raíces (Jarvis, 1996), ya que las peroxidasas catódicas tienen también actividad AIA-oxidasa.

Además, para estimular el enraizamiento es recomendable reducir las sales del medio de cultivo y elevar la concentración de sacarosa en el medio, lo cual da como resultado un crecimiento vigoroso de las raíces (Abdelnour y Escalant 1994); por esta razón se empleó el medio de cultivo MS Modificado, que consistió en diluir el contenido de sales a la mitad a excepción del Hierro EDTA, se incrementó la concentración de tiamina HCl (2.5 mg/l) puesto que se sabe que aumenta el vigor de las raíces (Linsmaier y Skoog, 1965). Finalmente se incrementó la sacarosa (40g/l). A pesar de ello se obtuvieron resultados no favorables, puesto que se generó callos, posiblemente por emplear una concentración muy alta de citoquinina, que coinciden con los resultados de Hutchinson (1994); Zimmerman y Fordham (1995), quienes obtuvieron abundantes callos utilizando ANA, o también a diferencias en el estado fisiológico de origen desconocido (Welandar, 1993).

Se evaluó diferentes concentraciones de IBA (0.0mg/L; 0,5mg/L; 1,0mg/L; 1,5mg/L) incorporado una base de 0,1mg/L de ANA + 1mg/L de Riboflavina). Obteniéndose resultados en con el tratamiento 2 (0,5mg/L de IBA) el cual presentó 3 explantes enraizados, en el resto de tratamientos se presentó pérdidas significativas por callo, contaminación bacteriana y oxidación.

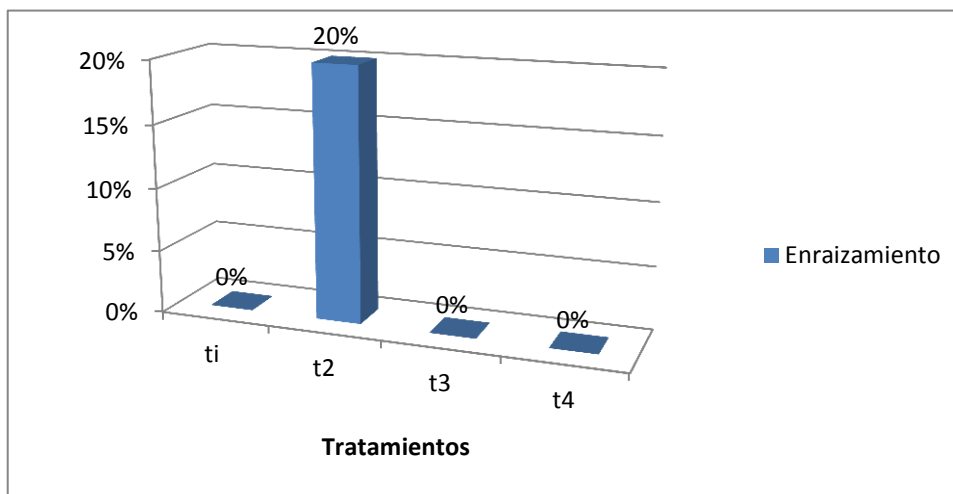
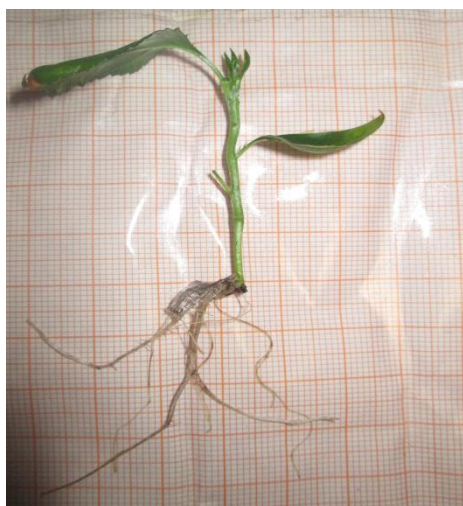


Grafico 23. Respuesta del tratamiento 2 (0,5mg/L de IBA) en la fase enraizamiento de brotes de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014.



Fotografía 10. Brote con raíz

#### 4.4. Análisis Económico

El análisis económico se realizó utilizando el método presupuesto parcial de Perrín, tomando en cuenta los tratamientos donde se obtuvo resultados. Se definieron dos categorías de costos: los costos variables de producción y los costos fijos.

##### 4.4.1. Análisis económico para la fase de desinfección

El análisis económico para esta etapa se hizo considerando los productos para la desinfección, los antioxidantes, fungicidas y bactericidas (Anexo 12). Obteniéndose los beneficios netos para cada tratamientos (Cuadro 32) con un valor de 1,65 USD por explante viable.

Cuadro 32. Costos que varían y beneficios netos para la desinfección de explantes de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014.

tratamientos	Rendimiento plantas	Rendimiento ajustado 10%	Beneficio bruto USD	Total costos que varían USD	Beneficios netos USD
T1	71,68	64,512	106,67	67,866624	38,21
T2	189,44	170,496	281,59	179,361792	101,63
T3	307,2	276,48	468,96	303,29856	165,06
T4	460,8	414,72	703,33	454,94784	247,79
T5	179,2	161,28	280,90	184,18176	96,12
T6	51,2	46,08	80,40	52,62336	27,18

El cuadro 33 muestra los tratamientos que mayor tasa de retorno marginal se obtuvo; siendo el mejor tratamiento t4 (hipoclorito de sodio al 10% durante 15 minutos), el costo que varían fue de US\$ 454,95 el beneficio neto fue de US\$ 247,79 el cual incluye una tasa de retorno marginal de 54,55%.

Cuadro 33. Tasa de retorno marginal para la desinfección de explantes de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014.

tratamientos	Total costos que varían USD	Beneficios netos USD	Beneficios Netos Marginales	Costos que varían marginal	TAMIR %
T3	303,30		63,43		
T4	454,95	247,79	82,73	151,65	54,55

#### 4.4.2. Análisis económico para la fase de brotación

Para el análisis económico de esta fase se consideró los medios de cultivo utilizados así como las concentraciones de hormonas en cada tratamiento (Anexo 13). Obteniéndose los beneficios netos para cada tratamiento (Cuadro 34) con un valor de US\$ 0,84 por brote.

Cuadro 34. Costos que varían y beneficios netos para la fase de brotación de explantes de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014.

tratamientos	Rendimiento plantas	Rendimiento ajustado 10%	Beneficio bruto USD	Total costos que varían USD	Beneficios netos USD
T1	240,64	216,58	183,528	170,547	12,921
T2	499,20	449,28	380,756	353,849	26,907
T3	596,48	536,83	454,951	422,804	32,146
T4	220,16	198,14	167,958	156,080	11,878
T5	245,76	221,18	172,808	159,551	13,257
T6	460,80	414,72	324,047	299,208	24,839
T7	596,48	536,83	419,519	387,373	32,146
T8	235,52	211,97	165,685	152,979	12,705

El cuadro 35 muestra los tratamientos que mayor tasa de retorno marginal se obtuvo; siendo el mejor tratamiento t7 (1ppm de BAP en el medio de cultivo MSM), el costo que varían fue de US\$ 3873,73 el beneficio neto fue de US\$ 52,39 el cual incluye una tasa de retorno marginal de 15,63%.

Cuadro 35. Tasa de retorno marginal para la desinfección de explantes de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014.

tratamientos	Total costos que varían USD	Beneficios netos USD	Costos que varían marginal	Beneficios Netos Marginales	TAMIR %
T6	2992,08		128,661		
T7	3873,73	32,46	33,523	5,239	15,63

## 5. CONCLUSIONES

- 5.1. Manzana Emilia es una especie que contiene muchos contaminantes microbianos y es susceptible a la oxidación de tejidos lo cual dificulta el rescate de esta especie mediante cultivo de tejidos *in vitro*.
- 5.2. El antioxidante Carbón activado (CA) a una concentración de 1g/L en combinación con polivinilpirrolidona (PVP) 1g/L ayudó a reducir la oxidación en la fase de establecimiento.
- 5.3. El mejor tratamiento de desinfección para el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de manzana Emilia fue el tratamiento t4 (hipoclorito de sodio al 10% durante 15 minutos) en el medio de cultivo MSM y CHU, debido a que permite alcanzar un alto porcentaje de viabilidad (77%) y reducir de forma homogénea la oxidación y contaminación (23%) para ambos casos.
- 5.4. El tiempo de recolección de los explantes fue muy importante, siendo la temporada de sequía el más óptimo para reducir la contaminación y por ende para garantizar de mejor manera el proceso de micropropagación de manzana Emilia.
- 5.5. Los tratamientos m2d2 (CHU + 1 ppm de BAP) y m1d2 (MSM + 1 ppm de BAP) resultaron iguales en efectividad, ya que permitieron obtener un promedio de 2,33 brotes por explante, y una longitud de 6,20cm y 5,51cm respectivamente.
- 5.6. De acuerdo al análisis económico para la fase de desinfección el tratamiento t4 (hipoclorito de sodio al 10% durante 15 minutos) fue el más rentable puesto que permite obtener una Tasa Marginal de Retorno del 54,55%. Y para la fase de brotación el tratamiento t7 (1ppm de BAP en el medio de cultivo MSM), presentó mayor rentabilidad con una Tasa Marginal de Retorno 15,64%.



## **6. RECOMENDACIONES**

- 6.1. Usar para la fase de establecimiento el tratamiento de desinfección t4 (10 % NaClO x 15 minutos) debido a que permite obtener mayor cantidad de explantes viables, ofreciendo mayor rentabilidad (54,55%); así como también el empleo de los medios de cultivo MSM y CHU(N6) suplementado con 1g/L de carbón activado más 1g/L de polivinilpirrolidona (PVP) sin hormonas.
- 6.2. Luego de la siembra se recomienda proteger los explantes de la luz por un periodo de 5 días, así como también iniciar el período de incubación a condiciones ambientales de laboratorio durante 1 día.
- 6.3. Utilizar en la fase de inducción de brotes el tratamiento m2d2 con el medio de cultivo CHU et al., 1976 suplementado con 1g/L de carbón activado, 1ppm de BAP y 1,5ppm de giberelinas (GA<sub>3</sub>), ya que permite obtener mejores resultados y es el más rentable (15,64%).
- 6.4. Se recomienda además continuar con los estudios de propagación in vitro de manzana Emilia con el fin de obtener plantas completas adaptadas a campo para conservar esta especie.

## 7. RESUMEN

El cultivo de manzana en el país es tan antiguo como su historia colonial, donde los productores locales, que en su mayoría poseen huertos familiares en los cuales se usan técnicas muy antiguas, con un desconocimiento de las técnicas modernas usadas entre los principales productores. (Montalván, 2009 citado por Criollo, 2011). La diversidad de climas permite que el cultivo de manzana cuenta con una producción local autosuficiente localizada en las provincias de Chimborazo, Cotopaxi, Azuay, Cañar y principalmente en Tungurahua, sin embargo en los últimos 12 años factores como: la crisis financiera local del año 98, la baja productividad en la producción de manzanas, la apertura de mercados externos y la creciente demanda por la fruta, evidencia que actualmente el 85% del consumo interno de manzana sea importado (PROCHILE, 2011). De esta forma, se da la búsqueda de nuevas alternativas que aporten a una a la economía agrícola e industrial de la zona central del país, en la cual se toma en cuenta una de las principales frutas representativas cultivadas en la provincia de Tungurahua, como es la manzana, variedad Emilia (*Malus communis* -Reineta Amarilla de Blenheim), que presenta cualidades muy apetecidas por el consumidor final como su jugosidad, dulzor y sabor (Salazar, 2010). La micropropagación de la manzana ha jugado un papel importante en la producción de plantas sanas, libres de enfermedades y en la rápida multiplicación de esquejes y porta injertos con características deseables, éxito que se lo obtiene con meristemos pre-existentes (cultivo de yemas apicales o segmentos nodales) (Dobrannszki, 2010).

El estudio se inició con el acondicionamiento de las plantas donadoras en campo, obtenidas en el huerto frutal del Señor Hugo Ruiz, en el barrio Huaynacuri de la parroquia San Miguelito del Cantón Píllaro, el cual consistió en podas de saneamiento, controles fitosanitarios y fertilizaciones edáficas. Se colectó juveniles en pleno desarrollo, los mismos que se colocaron en fundas plásticas tipo ziploc para su traslado en cajas de cartón hasta el laboratorio. Posteriormente se realizó la formación de segmentos nodales, utilizando una tijerara de podar desinfectada, una vez obtenidos los explantes se realizaron dos lavados con agua potable y detergente (2g/500ml), a la solución se añadió Tween 20 (2 gotas/100ml) y se mantuvo en constante agitación durante 10 minutos, posteriormente se realizó tres enjuagues utilizando agua destilada, Después se realizó la inmersión de los explantes en soluciones independientes de Mancozeb (2,5g/500ml) y sulfato de cobre pentahidratado (3ml/500ml de agua) en ambos casos durante 20 minutos en agitación, luego de ello se realizaron tres lavados de dos minutos cada uno utilizando agua destilada. En cámara de flujo laminar se introdujo los explantes en etanol al 70% durante 30 segundos, en seguida se realizó tres

enjuagues de 1 minuto cada uno utilizando agua destilada estéril, posteriormente se realizó la sumersión de los explantes en hipoclorito de sodio, probando los diferentes tratamientos de desinfección, luego de ello se realizó tres enjugues con agua destilada estéril de un minuto cada uno, para finalmente sumergir los explantes en una solución de ácido cítrico (0,300 g/L) durante el tiempo que dure la siembra. Se utilizó los medios de cultivo Murashige & Skooge Modificado (MSM) y CHU et al., 1976 (N6), en los que se adicionó 1g/L de carbón activado, 1g/L. de polivinilpirrolidona (PVP) sin hormonas. Se sembraron 2 explantes por frasco, los mismos que se incubaron en obscuridad durante 5 días, iniciando la incubación a condiciones de laboratorio durante 1 día.

Para el establecimiento de los explantes en la fase de brotación, se colocó los explantes sobre papel absorbente esterilizado y con la ayuda de una pinza y bisturí se reanimó el tejido cortando las partes oxidadas, se colocó en los medios para brotación que tenían como base 1.5 ppm de giberelinas (GA3), MSM y CHU (N6) a diferentes concentraciones de 6-Bencil Amino Purina (0.0; 0.3; 0.6; 0.9 ppm BAP), se selló los frascos y etiquetó. Los explantes sembrados al final de este proceso, se transfirieron al cuarto de cultivo donde se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (26 °C), humedad (60 %) y fotoperiodo (16/8 horas). Transcurridos 30 días se cambiaron los explantes a nuevos medios con las mismas características y se mantuvieron por 30 días más. Al culminar este período se procedió con la toma de datos de las variables (1. Días a la brotación, 2. Número de brotes /explante y 3. Longitud de brote/explante). La unidad experimental estuvo constituida por un explante. El análisis estadístico se realizó utilizando un diseño completamente al azar con seis observaciones.

Para iniciar la fase de enraizamiento en cámara de flujo laminar, se seleccionó los brotes provenientes de la fase de brotación que tuvieron una longitud mayor a 3 cm, se los colocó en el medio para enraizamiento MSM con 40 gramos de sacarosa, 4gramos/litro de agar, se evaluó diferentes concentraciones de IBA (0.0mg/L; 0,5mg/L; 1,0mg/L; 1,5mg/L) incorporado una base de 0,1mg/L de ANA + 1mg/L de Riboflavina). Los explantes sembrados al final de este proceso, se transfirieron al cuarto de cultivo donde se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (26 °C), humedad (60 %) y fotoperiodo (16/8 horas). Durante el proceso se constató la pérdida progresiva de los brotes por callo, oxidación y contaminación, por ello no fue posible analizar los tratamientos mediante diseño experimental puesto que se obtuvieron resultados únicamente con el tratamiento 2 (0,5mg/L de IBA) el cual presentó 3 explantes enraizados.

Conforme a los resultados obtenidos se concluyó que: el mejor tratamiento de desinfección para el establecimiento in vitro de segmentos nodales de manzana Emilia fue el tratamiento t4 (hipoclorito de sodio al 10% durante 15 minutos) en el medio de cultivo MSM y CHU, debido a que permite alcanzar un alto porcentaje de viabilidad (77%) y reducir de forma homogénea la oxidación y contaminación (23%) para ambos casos. En la fase de inducción de brotes, los tratamientos m2d2 (CHU + 1 ppm de BAP) y m1d2 (MSM + 1 ppm de BAP) resultaron iguales en efectividad, ya que permitieron obtener un promedio de 2,33 brotes por explante, y una longitud de 6,20cm y 5,51cm respectivamente. El costo de producción hasta la fase de brotación fue de 3,90 USD por brote en la estimación de 1324 brotes viables.

Además se recomendó Usar para la fase de establecimiento el tratamiento de desinfección t4 (10 % NaClO x 15 minutos) debido a que permite obtener mayor cantidad de explantes viables; así como también el empleo de los medios de cultivo MSM y CHU(N6) suplementado con 1g/L de carbón activado más 1g/L de polivinil pirrolidona (PVP) sin hormonas. Luego de la siembra se recomienda proteger los explantes de la luz por un periodo de 5 días, así como también iniciar el período de incubación a condiciones ambientales de laboratorio durante 1 día. Utilizar en la fase de inducción de brotes el tratamiento el medio de cultivo CHU *et al.*, 1976 suplementado con 1g/L de carbón activado, 1ppm de BAP y 1,5ppm de giberelinas (GA<sub>3</sub>), ya que es el más apropiado. Se recomienda además continuar con los estudios de propagación in vitro de manzana Emilia con el fin de obtener plantas completas adaptadas a campo para conservar esta especie.

## SUMARY

The apple crop in the country is as old as its colonial history, where local producers, who mostly have home gardens in which very old techniques are used, with a lack of modern techniques used among the main producers. (Montalvan, 2009 quoted by Criollo, E. 2011). Diverse climate allows the cultivation of apple has a localized self-sufficient local production in the provinces of Chimborazo, Cotopaxi, Azuay, Canar, and mainly in Tungurahua, however in recent 12 years factors such as local financial crisis of 98, low productivity in apple production, the opening of foreign markets and the increasing demand for the fruit, shows that 85% of domestic consumption of apple is imported (PROCHILE, 2011). Thus, there is the search for new alternatives that contribute to agricultural and industrial economy of the central region, which we consider one of the main fruits cultivated representative in the province of Tungurahua, as is apple, Emilia variety (*Malus communis*-Blenheim Pippin Yellow) having qualities highly prized by the final consumer as juiciness, sweetness and flavor. (Salazar, 2010). Micropropagation of the apple has played an important role in the production of disease-free, healthy plants and the rapid multiplication of cuttings and rootstocks with desirable traits, success is only available with pre-existing meristems (shoot-tip culture or nodal segments) (Dobrannszki, 2010).

The study began with the conditioning of donor plants in the field, obtained in the orchard of Mr. Hugo Ruiz, in the neighborhood of the parish Huaynacuri San Miguelito Píllaro Canton, which consisted sanitation pruning, phytosanitary controls and soil fertilization . Juveniles was collected in full swing, the same type were placed in Ziploc plastic bags for shipment in cardboard boxes to the laboratory. Subsequently the formation of nodal segments was performed using a pruning tijerara disinfected explants obtained after two washes were performed with water and detergent (2g/500ml), the Tween 20 solution (2 gotas/100ml) was added and was kept under constant stirring for 10 minutes, then three washes using distilled water is performed, after the immersion of the explants were made in separate solutions of mancozeb (2.5 g/500ml) and copper sulfate pentahydrate (water 3ml/500ml) in both cases over 20 minutes with stirring, after that three washes of two minutes each were performed using distilled water. In laminar flow chamber explants were introduced in 70% ethanol for 30 seconds, then three rinses of 1 minute each using sterile distilled water was performed, then the submersion of the explants were made in sodium hypochlorite, testing different disinfection treatments after that three enjugues performed with sterile distilled water for one minute each, and finally immersing the explant in a solution of citric acid (0.300 g / L) during the duration of the seed. Means Skooge Murashige & Modified (MSM) and Chu et al was used. 1976 (N6), which was added 1 g / L of activated carbon, 1 g / L. polyvinylpyrrolidone

(PVP) without hormones. 2 explants were plated per vial, the same that were incubated in dark for 5 days, starting the incubation to laboratory conditions for 1 day.

For the establishment of explants in the budding stage, explants on sterile absorbent paper and placed with tweezers and scalpel cutting tissue revived rusted parts, placed in the means that were based budding 1.5 ppm gibberellin (GA3), MSM and CHU (N6) at different concentrations of 6-Benzyl Amino Purine (0.0, 0.3, 0.6, 0.9 ppm BAP), the bottles were sealed and labeled. The explants planted at the end of this process, were transferred to the culture room where they were kept under controlled conditions of temperature (26 ° C), humidity (60%) and photoperiod (16/8 hours). After 30 days the explants were moved to new media with the same characteristics and were maintained for 30 days. At the end of this period we proceeded with data collection of variables (1.Días to sprouting, 2. No. of shoots / explant and 3. Bud length / explant). The experimental unit consisted of an explant. Statistical analysis was performed using a completely randomized design with six observations.

To start the rooting phase in laminar flow chamber, the buds from sprouting stage that had a length greater than 3 cm, was selected will be placed in the rooting medium for MSM with 40 grams of sucrose, 4gramos/litro of agar, different concentrations (IBA, 0.5 mg / L, 1.0 mg / L, 0.0 mg / L 1.5 mg / L) was evaluated incorporated base 0.1 mg / L NAA + 1 mg / L of Riboflavin) . The explants planted at the end of this process, were transferred to the culture room where they were kept under controlled conditions of temperature (26 ° C), humidity (60%) and photoperiod (16/8 hours). During the progressive loss of shoots per callus, oxidation and contamination was found, so it was not possible to analyze the experimental treatments by design since results were obtained only with treatment 2 (0.5 mg / L IBA) which presented three explants rooted.

In accordance to the results obtained it was concluded that: the best disinfection treatment for in vitro establishment of nodal segments apple Emilia was the treatment t4 (sodium hypochlorite 10% for 15 minutes) in the culture medium MSM and CHU, because it allows a high percentage of viability (77%) and uniformly reduce oxidation and contamination (23%) for both cases. In the induction phase of outbreaks, treatments M2D2 (CHU + 1 ppm BAP) and m1d2 (MSM + 1 ppm BAP) were equal in effectiveness, and leveraging an average of 2.33 shoots per explant, and length of 6.20 cm and 5.51 cm respectively. The cost of production to sprouting phase was USD 0.26 per outbreak in 1324 estimating viable buds.

Use recommended addition to the establishment phase t4 disinfection treatment (10% NaClO x 15 minutes) because it allows for greater amount of viable explants; and also the use of the culture

media and MSM CHU (N6) supplemented with 1 g / L of activated charcoal 1g / L of polivinilpirrolidone (PVP) without hormones. After planting is recommended to protect the explants of light for a period of 5 days, as well as starting the incubation period at ambient laboratory conditions for 1 day. I use in the induction phase of treatment sprouts culture medium CHU et al. 1976 supplemented with 1 g / L of activated carbon, 1 ppm 1.5 ppm BAP and gibberellins (GA3), as is most appropriate. It is further recommended to continue studies in vitro propagation of apple Emilia in order to obtain complete plants adapted to field to conserve this species.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- ABDELNOUR, A.; ESCALANT, J. 1994. Conceptos básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales. Cali, CO. IICA. p. 3-7
- ÁLVAREZ, S., 1983. El manzano, 4 ed. Madrid, ES. Editorial Publicaciones de extensión agraria. p. 24 –26, 400 –411
- BATISTA, J. 1999. Limitações ao processo de cultivo in vitro de espécies lenhosas. Recursos Genéticos e Biotecnología. Sao Paulo, BR. Embrapa. p.78
- BAYAS, T. 1989. Elaboración de vino de manzana (*Malus communis*). Tesis Ing. En Almtos Ambato, EC. Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ingeniería en Alimentos. p. 10-14
- BERTHOULY, M. 1987. Tecnología del cultivo in vitro de café. Cali, CO. IICA. Manual N°. 1 p.15
- BHOJWANI, S.; RAZDAN, M. 1996. Plant tissue culture: theory and practice (Revised edition). Netherlands: Elsevier. p.74
- BIOPLASMA (LABORATORIOS SA), 2001. Micropropagación del portaingerto clonal de manzana MM 106. Lima, PE. Nuevo mundo editores. p. 23-24
- BRIDG, H. 2000. Micropropagation and determination of the in vitro STABILITY of Annona cherimolia Mill. and Annona muricata. Phd Dissertation. Berlin, DE. Humboldt-Universitat. 155p.
- CABRERA, A. 2003. Efecto de antioxidantes, desinfectantes, medios de cultivo y reguladores de crecimiento, en la propagación in vitro del cultivo de yemas axilares de melocotón (*Prunus pérsica* L.) Batsch var. Salcaja. (Documento en línea) San Carlos GT. Consultado 13 de nov 2013 Disponible en: [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01\\_2045.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01_2045.pdf).pg 65-73.
- CÁCERES, K. 2009. Propagación in vitro de los portaingertos de cerezo (*Prunus avium* L.) GISELA 5 Y *Prunus cerasus*. (Documento en línea). Valparaiso CH. Consultado el 20 de oct 2013 Disponible en: [http://ucv.altavoz.net/prontus\\_unidacad/site/artic/20061214/pags/20061214132853.html](http://ucv.altavoz.net/prontus_unidacad/site/artic/20061214/pags/20061214132853.html)
- CASELLS, A. 1997. Pathogen and microbial contamination management in micropropagation. Kluwert, PL. Dordrech. p. 448
- CHIN, C., 1982. Some characteristics of the phosphate uptake by *Petunia* cells. HortScience. 17: 448
- CLARKSON, D.; HANSON, J. 1980. The mineral nutrition of plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 19: 239-298
- COQUE, M.; DÍAS, M.; GARCÍA, J. 2012. El cultivo del manzano: variedades de sidra y mesa. Madrid, ES. Editorial Mundiprensa. 221p.



CRIOLLO, E. 2011. Desarrollo tecnológico de vino de frutas a partir de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) y manzana variedad emilia (*Malus communis* –reineta amarilla de Blenheim), de adecuada calidad sensorial, Tesis Ing. en Alimentos. Ambato EC. Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ingeniería en Alimentos. p. 45-46

CRIOLLO, H. 2011. Establecimiento de un protocolo para la propagación masiva in vitro de cabuya azul (*Agave americana* L.) y cabuya blanca (*Furcraea andina* Trel). Tesis Ing. En Biotecnología Sangolquí, EC. Escuela Politécnica del Ejército, Carrera de Biotecnología. p. 132

CRUICKSHANK, L.; DUDMAN, W.; PEOPLES, M.; SMITH, M. 1987. Elicitation of pisatin in pea (*Pisum sativum* L.) by copper-asparagine complexes. Aust. J. Plant Physiol. 14: 549-559

CSBD. 2009. Convenio sobre la Diversidad Biológica. (Documento en línea) Quito, EC. Consultado el 13 nov 2014 Disponible en: [http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2012/07/CDB\\_Informe-sobre-la-Conservacio%C2%81n-de-las-Especies-Vegetales.pdf](http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2012/07/CDB_Informe-sobre-la-Conservacio%C2%81n-de-las-Especies-Vegetales.pdf)

DE LA FUENTE, E.; BLÁZQUEZ, M. 2009. Descripción de las variedades de manzana de la D.O.P. Sidra de Asturias. Asturias, ES. Editorial Serida. p. 7 –10

DIARIO EL COMERCIO, 2011. Seis variedades de manzanas se encuentran en la Sierra centro. (Documento en línea) Quito, EC. Consultado 13 de nov 2014 Disponible en: <http://www.elcomercio.com.ec/actualidad/negocios/seis-variedades-de-manzanas-se.html>

DOBRANNSZKI, J. 2010. Micropropagation of apple. (Documento en Línea), Rio de Janeiro, BRA. Consultado el 13 de nov 2013 Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975010000285>

DUART, P.; KEVES, C.; GASPART, T. 1992. In vitro promotion of root formation through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases. Pflanzenphysiol. Ohio,US. British library. p. 429-436

EDWIN, G. 2008. Plant propagation by tissue culture 3 ed. Netherlands. Springer. p. 37

EDWIN, G.; MICHAEL, H.; JAN DE KLERK GEERT. 2008. Plant propagation by tissue culture. 3 ed. Netherlands. Springer. p. 156

FAO (Food and Agriculture Organization), 2010. Conservación de germoplasma (Documento en línea) Consultado el 13 de nov 2013 Disponible en: [http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2012/07/CDB\\_Informe-sobre-la-Conservacio%C2%81n-de-las-Especies-Vegetales.pdf](http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2012/07/CDB_Informe-sobre-la-Conservacio%C2%81n-de-las-Especies-Vegetales.pdf)

FRIML, J. 2003. Auxin transport-shaping the plant. Curr. Opin. Plant Biol. Worldbook Company. 12: 1-6

GEORGE, E.; SHERRINGTON, P. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture: England. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. p. 109

GITTINS, C. 2013. Origen e Historia de la Manzana: La manzana y la pera en el alto valle. Madrid, ES. Willey. 11p.

GUERRERO, E.; SILVA, A. 1992. Estudio del almacenamiento de manzanas en una cámara enfriada bajo condiciones ambientales, Tesis Ing. Alimentos, Ambato, EC. Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ingeniería en Alimentos. p. 14 –16

GOLDBACH, H.; AMBERGER, A. 1986. Influence of boron deficiency on iaa uptake and efflux in cell cultures of *Daucus carota* L. Netherlands. Plant Growth. p. 81-86

HARTMANN, K. 1997. Propagación de Plantas. México DF., MX. Continental Inc. 760 p.

HEWITT, E. 1948. Relation of manganese and some other metals to the iron status of plants. Nature. 23: 161-489

HUTCHINSON, J. 1994. Plant Regeneration and Genetic Variability. Factors affecting shoot proliferation and root initiation in organ cultures of apple: Northern spy. Sci. Hortic. Academic Press Inc. 3: 235-239

HURTADO, D.; MERINO, M. 1998. Cultivo de tejidos vegetales. México DF., MX. Ediciones Trillas. p. 123-124

IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, BR.) 2010. Recursos Fitogenéticos en los Trópicos Suramericanos. Embrapa. p. 21

INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, EC.) 2013. Conservación de germoplasma. Generación de Bioconocimiento para la conservación y uso sostenible de la Agrobiodiversidad nativa en el Ecuador en apoyo a la seguridad y soberanía alimentaria. p. 1-17

\_\_\_\_\_ 1997. Manual Agrícola de los principales cultivos del Ecuador, (Documento en línea), Quito, EC. Consultado el 13 de nov 2013 Disponible en: <http://www.crystal-chemical.com/manzano.htm>

IRVINE, J.; FITCH, M.; MOORE, P. 1983. The induction of callus in sugarcane tissue cultures by selected chemicals: Plant cell tiss. Springer. 2: 141-149

JARAMILLO, C. 2013. Evaluación de medios de cultivo para la Micropropagación de Arrayán (*Myrcianthes hallii* O. Berg. Mc Vaugh. Tesis de Ing. Agr. Quito, Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas. 87 p.

- JARAMILLO, P. 2006. Establecimiento del cultivo in vitro de *Polylepis microphylla* como futura estrategia de conservación de la especie en la provincia de Chimborazo. Tesis en Ing. Biotecnología. Sangolquí, EC. Escuela Politécnica del Ejército. Carrera de Biotecnología. 112 p.
- JARVIS, B. 1996. Endogenous control of adventitious rooting in non woody cuttings. En new root formation in plants and cuttings. Netherlands. MB Jacson editions. p. 191-222
- JIMÉNEZ, A.; MENDOZA, E. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología Instituto de Biotecnología de plantas. Santa Clara, CU. p.225-240
- JONSON, C.; BROYER, T.; CARLTON, A. 1957. Comparative chlorine requeriments of different plants species. *Plant Soil*, 8:337-353
- JOUANNEAU, J. 1971. Controle par les cytokinines of the synchronisation desmitoses dans les cellules de tabac. United States. EMBO. p. 329-337
- KLEIN, R.; CAPUTO, E.; WITTERHOLT, B. 1962. The role of zinc the growth of plant tissue cultures. United States. *Am. J Bot.* 49: 323-327
- KULAEVA. 1980. Cytokinin action on enzyme activities in plants. in Skoog. Netherlands. Springer. p. 119-128
- LARA, L. 2010. Píllaro de ayer y hoy. Riobamba, EC. Imprenta Freire. p. 15-23
- \_\_\_\_\_ 2013. Por los caminos de Píllaro. Riobamba, EC. Imprenta Freire. 64 p
- LEGRAND, B. 1975. Action of iron and edta on the neoformation of buds, by the leaffragments of endive cultivated in vitro. Paris, FR. *Compt. Rend. Acad. Sci.* 26: 2215-2218
- LI, C.; DANIEL, F.; ROMHELD, V.; BANGHERTH, F. 2001. Effects of boron startvation on boron compartmentation, and possibly hormone-mediated elongation growth and apical dominance of pea (*Pisum sativum* L.) plants. *Worldbooks Inc.* 17: 212-219
- LIBBENGA K.; MENNES A. 1995. Hormone binding and signal transduction. Davies P. *Plant hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. New York, US. Worldbooks Inc. 2 ed. p124-168
- LINSMAIER, E.; SKOOG, F. 1991. *Plant Cell and Tissue Culture*. Organic growth factor requerimientos of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. Netherlands. Kluwert Academic Publisers. p. 100-127
- LIU, C.; XU, Z.; CHUA, N. 1993. Polar transport is essential for the establissment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. United States. *Plant Cell.* 5: 621-630

- LYNDANE, K. 2013. Apple Media. Plants from test tubes and Introduction to Micropropagation . London: Timber press. p. 121
- MARTÍNEZ, M.; PACHECO, J. 2006. Protocolo para la micropropagación de *Furcraea macrophylla* Baker. Cali, CO. Agronomía Colombia. p. 207-213
- MARIN, J. 1997. La micropropagación y la mejora de especies frutales. Zaragoza ES. Artes Gráficas. p. 35
- MENGEL, K. 1982. Principles of plant nutrition. 3 ed. Bern, CH. Internat. Potash Institute, p.174
- MITSUKAWA, E.; OKUMURA S, SHIRANO,Y.; SATO, S.; KATO,T.; HARASHIMA, S.; SHIBATA, D. 1997. Overexpression of an Arabidopsis thaliana High-affinity phosphate-limited conditions. United States. Proc. National Academy Science. 94:7098-7102
- MONTALVÁN, N.; VILLACÍS, H. 2009. Proyecto de Producción y comercialización de manzana (variedad red delicious) en el Cantón Girón, Provincia del Azuay. (Documento en línea) Cuenca, Ec. Consultado el 13 de nov 2014 Disponible en: <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/1198/1/2336.pdf>
- MORIGUCHI, T. 1989. Prolonged storage of grape nodal culture using a low concentration of ammonium nitrate. HortScience 24: 372-373
- NISSSEN, S.; SUTTER, E. 1990. Stability of iaa and iba in nutrient medium to several tissue culture procedures. Netherlands. Springer. HortScience. 25: 800-882
- OLMOS, S. 2009. Biotecnología y mejoramiento vegetal. (Documento en línea). Santiago, CL. Consultado el 13 de nov 2014. Disponible en: <http://www.biblioteca.org.ar/libros/150415.pdf>.
- ORDÓÑEZ, I. 2013. Evaluación de medios de cultivo sobre las fases de micropropagación in vitro de la especie forestal nativa yagual (*Polylepis incana*). Tesis Ing. Biotecnología. Sangolquí, EC. Escuela Politécnica del Ejército, Carrera de Biotecnología. 189 p.
- PADILLA, I.; ENCINA, L. 2003. Micropropagation of adult cherimolia (*Annona cherimolia* Mill.) fino de jete. Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biotecnología. Estación Experimental La Mayora. Málaga, ES. Algarrobo-Costa. 17 p.
- PALIZ, K. 2012. Desarrollo de un protocolo de micropropagación de chirimoya (*Annona cherimolia*) a partir de segmentos nodales para la producción masiva de plantas de alto rendimiento. Tesis de Ing. En Biotecnología. Sangolquí, EC. Escuela Politécnica del Ejército, Carrera de Biotecnología. 157 p.
- PÉREZ, R. 2013. Diccionario Biográfico Ecuador. (Documento en línea) Quito, EC. Consultado el 13 nov 2014 Disponible en: <http://www.diccionariobiograficoecuador.com/tomos/tomo14/t2.htm>
- PIERIK, R. 1990. Cultivo in vitro de plantas superiores. 3 ed. Madrid, ES. Mundiprensa. p. 325

PROCHILE, 2011. Estudio de Mercado Manzanas en Ecuador. (Documento en línea) Quito, EC. Consultado el 13 de nov 2014 Disponible en: [http://www.prochile.gob.cl/wp-content/blogs.dir/1/files\\_mf/documento\\_06\\_21\\_11164640.pdf](http://www.prochile.gob.cl/wp-content/blogs.dir/1/files_mf/documento_06_21_11164640.pdf)

PUENTE, J.; MARIN, J. 1999. Estudio del enraizamiento in vitro del manzano (*Malus x domestica* Borkh.) con riboflavina. Dpto de pomología. Zaragoza, ES. E.E. De Aula Dei (CSIC). p. 123-128

RAMÍREZ, M.; URDANETA, A.; LEÓN DE SIERRALTA, S. 2002. Establecimiento in vitro de explantes adultos del guanabo (*Annona muricata* L.) tratados con hipoclorito de sodio., Rev Fac Agron. Universidad Nacional de Colombia. 19: 1-8

RASHOTTE, A.; MAXWELL, B.; KIEBER, J. 2005. The interaction of cytokinin with oter signals. *Physiol Plantarum*. United States. Wiley-Blackwell Publishing. 123: 1184-1194

REID, J.; Y HOWELL, S. 1995. The functioning of hormones in plant growth and development. *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. 2 ed. Michigan, US. University of Michigan. p. 448-485

REUVENY, Z.; DOUGALL, D.; TRINITY. 1980. Regulatory coupling nitrate and sulfate assimilation pathways in cultured tobacco cell. *Proc. Natl. acad. Sci*. 21: 6670-6672

ROCA, W. 1997. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Cali, CO, L. INGRAMEX. p. 27, 124,125

RODRIGUEZ, H.; RIVERA, M. 2003. Propagación in vitro de (*Artemisia absinthium* L). Revista cuabana de plantas medicinales. La nación. 32: 17-18

RIVERO, M. 2011. Cultivo de tejidos vegetales. Agrobiotecnología. Buenos Aires. AR. Omega. p. 123-124

SABIT. 2006. Cultivo de tejidos en la agricultura. Universidad Central del Ecuador Facultad de Ciencias Agrícolas Laboratorio de Biotecnología Agrícola. p. 16-17

SALAZAR, G. 2010. Estudio de la influencia de tres variedades de levaduras vínicas (*Saccharomyces bayanus* (LALVIN EC1118), *Saccharomyces bayanus* (LALVIN QA23), *Saccharomyces cerevisiae* var. *Cerevisiae* (LALVIN ICV OPALE)) y levadura de panificación (*Saccharomyces cerevisiae*) en la calidad sensorial del vino de manzana, variedad Emilia (*Malus communis*-Reineta Amarilla de Blenheim) Tesis de Ing. en Alimentos. Ambato, EC. Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ingeniería en Alimentos. p. 41-43

SAUDERS, M.; HELPER, P. 1981. Localization of membrane-associated calcium following cytokinin treatment in *Funaria* using chlorotetracycline. *United States. Biol Plant*. 152: 272-281

SOTOMAYOR, C. 2003. El Cultivo del Manzano. Agroenfoque 17. Lima, PE. N° 135:12-14

SORIA, N.; LEÓN, J 1992, El cultivo del manzano en la zona alta del Ecuador, Manual de frutales, Quito, EC. INIAP. 22 p.

SUBABARAO, G.; ITO O, BERRY, W.; WHEELER, R. 2003. Sodium a functional plant nutrient. Crit. Rev. United States. Plant Science. 33: 391-416

SUNDQVIST, C.; BJORN, L.; VIRGIN, H. 1980. Results and problems in cell differentiation. Verlag Heidelberg. Berlin, DE. Springer. p. 201-224

TINEO, J. 2003. Descriptores de germoplasma de chirimoya (*Annona cherimolia* Mill.). Lima, PE. INIA. p. 17-22

USDA, 2014. Scientists Seek To Sanitize Fruits and Vegetables (Documento en línea) United States. Consultado 13 de nov 2013. Disponible en: <http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/mar02/fruit0302.htm?pf=1>

VALLEJO, S. 2007. El Agro y Vida Rural en Ecuador: Comportamiento 200-2007 y Perspectivas 2008. Quito, EC. IICA. p. 12-15

VAN DER KRIEKEN, W.; BRETELER, H.; VISSER, M. 1992. The effect of the conversión of indolebutiryc acid into indoleacetic acido on root formation on microcuttings of *Malus*: Plant Cell Physiol. Granada, ES. Del Río, L. ediciones. p. 709-713

VALPIANA, T. 1997. La manzana. Barcelona, ES. Editoria. p. 24 - 27

VEGA, K. 2006. Massive propagation of *Polylepis tomentella* Weddell spp. Nana through in vitro culture techniques: Ecología en Bolivia, Natura Pint. 42: 102-120

WELANDER, M. 1993. In vitro rooting of the apple rootstock M.26 in adult and juvenile phases and acclimatization of the plantlets. Physiol Plant. Netherlands. Kluwert Academic Publisher. p.306

WYN JONES, R.; HUNT, O. 1967. The function of calcium in plants: Bot. Netherlands. Springer 33: 407-426

ZIMMERMAN, R. 1994. Rooting apple cultivars in vitro: Interactions among light, temperature, phloroglucinol and auxin. Plant Cell Tissue Organ Cut. San Diego, US. Elseiver Inc. 11: 301-311

-----; FORDHAM, I. 1995. Simplified method for roothing apple cultivars in vitro. London. Hortic. Sci. Academic Press inc. 3: 34-38

## 9. ANEXOS

**Anexo 1.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov para la variable días a la brotación en el rescate de germoplasma de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.1014.

		Días_brotación
N		48
Parámetros normales <sup>a,b</sup>	Media	,0004
	Desviación típica	1,00804
	Absoluta	,189
Diferencias más extremas	Positiva	,189
	Negativa	-,160
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,311
Sig. asintót. (bilateral)		,064

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

**Anexo 2.** Prueba de Levene para la variable días a la brotación en el rescate de germoplasma de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.1014.

F	gl1	gl2	Sig.
2,388	5	42	,054

**Anexo 3.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov para la variable número de brotes en el rescate de germoplasma de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.1014.

		Número_brotes
N		48
Parámetros normales <sup>a,b</sup>	Media	,0000
	Desviación típica	1,01158
	Absoluta	,252
Diferencias más extremas	Positiva	,252
	Negativa	-,252
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,749
Sig. asintót. (bilateral)		,054

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

**Anexo 4.** Prueba de Levene para la variable número de brotes en el rescate de germoplasma de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.1014.

F	gl1	gl2	Sig.
,256	5	42	,934



**Anexo 5.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov para la variable longitud de brotes en el rescate de germoplasma de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.1014.

		Altura_brotes
N		48
Parámetros normales <sup>a,b</sup>	Media	-,000417
	Desviación típica	1,0108369
	Absoluta	,077
Diferencias más extremas	Positiva	,061
	Negativa	-,077
Z de Kolmogorov-Smirnov		,533
Sig. asintót. (bilateral)		,938

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

**Anexo 6.** Prueba de Levene para la variable longitud de brotes en el rescate de germoplasma de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.1014.

F	gl1	gl2	Sig.
,489	5	42	,783

**Anexo 7.-** Composición del medio de cultivo Murashige y Skoo Modificado (MSM) en el rescate de germoplasma de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.2014.

Stock	Sales	Concentración inicial (g/l)	Concentración final (mg/l)	Volumen a usar (ml/l)
<b>I</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82.5	1 650	10
	K NO <sub>3</sub>	95.0	1 900	
<b>II</b>	Mg SO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	37.0	370	5
	Mn SO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	2.23	22.3	
	Zn SO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	1.058	10.6	
	Cu SO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0.0025	0.025	
<b>III</b>	Ca Cl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	44.0	440	5
	KI	0.083	0.83	
	Co Cl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	
<b>IV</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17.0	170	5
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.62	6.2	
	NaMoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.025	0.25	
<b>V</b>	Fe SO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	2.784	27.85	10
	Na <sub>2</sub> EDTA	3.724	37.25	
<b>Vitaminas</b>	Ácido nicotínico	100 ppm	0.5	0
	Piridoxina HCl	100 ppm	0.5	0
	Tiamina HCl	250 ppm	2.5	2.5
	Glicina	100 ppm	2.0	
	Myoinositol	10 000 ppm	100	10
	Sacarosa		30 000	
	Agar		7 000	
	pH 5.7			

**Anexo 8.** Composición del medio de cultivo CHU *et al.*, .1962 (N6) en el rescate de germoplasma de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.2014.

Stock	Sales	Concentración inicial (g/l)	Concentración final (mg/l)	Volumen a usar (ml/l)
<b>I</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	23.15	453	20
	K NO <sub>3</sub>	141.5	2830	
<b>II</b>	Mg SO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	18.5	185	10
	Mn SO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	0.30	4.40	
	Zn SO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.15	1.50	
<b>III</b>	Ca Cl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	12.53	166	10
	KI	0.08	0.80	
<b>IV</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	40	400	10
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.16	1.60	
<b>V</b>	Fe SO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	2.784	27.80	10
	Na <sub>2</sub> EDTA	3.73	37.30	
<b>Vitaminas</b>	Ácido nicotínico	0.15	1.50	10
	Piridoxina HCl	0.15	1.50	10
	Tiamina HCl	0.30	3.00	10
	Glicina	0.20	2.00	10
	Myoinositol	10 000 ppm	100	0,05
	Sacarosa		30 000	15
	Agar		7 000	4,00
	pH 5.8			

**Anexo 9.** Costos variables para formular un litro de medio de cultivo Murashige & Skoog Modificado en la evaluación de medios de cultivo en el rescate de germoplasma de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.2014.

COMPUESTO	UNIDAD	CANTIDAD	PRECIO (USD)	total (USD)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	g	0,4125	0,04	0,016500
KNO <sub>3</sub>	g	0,475	0,004	0,001900
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	g	0,0925	0,38	0,035150
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	g	0,0055	0,29	0,001595
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	g	0,002	0,308	0,000616
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	g	0,000013	0,08	0,000001
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	g	0,11	0,293	0,032230
KI	g	0,000415	0,54	0,000224
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	g	0,000013	0,91	0,000012
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	g	0,0425	0,17	0,007225
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	g	0,0015	0,179	0,000269
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	g	0,000013	0,48	0,000012
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	g	0,007	0,221	0,003094
Na <sub>2</sub> EDTA	g	0,0095	1	0,010203
Tiamina HCl	g	0,025	2	0,050425
Myoinositol	g	0,1	1	0,105200
Sacarosa	g	30	0,04	1,200000
Agar	g	7	1,44	10,08
carbón activo	g	1,00	1	0,500000
PVP	g	1,00	0	0,020000
TOTAL				12,06

**Anexo 10.** Depresicion anual de materiales y equipos utilizados en el rescate de germoplasma de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.2014.

<b>Materiales</b>	<b>Unidad</b>	<b>Costo Unitario (USD)</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo total (USD)</b>	<b>Vida útil (años)</b>	<b>Costo uso(USD)</b>
Espátula	Unidad	4	1	4	2	2,00
Mangos de Bisturí	Unidad	15	2	30	3	10,00
Pinzas	Unidad	20	2	40	3	13,33
Pipeta 10 ml	Unidad	2	1	2	2	1,00
Pipeta 1ml	Unidad	1,89	1	1,89	2	0,95
Probeta Graduada 500ml	Unidad	16,4	1	16,4	2	8,20
Probeta Graduada 25ml	Unidad	6,3	1	6,3	2	3,15
Frascos de vidrio	Unidad	0,4	5000	2000	3	666,67

**TOTAL:**  
**705,30 USD**

<b>Equipo</b>	<b>Unidad</b>	<b>Costo (USD)</b>	<b>Vida útil (años)</b>	<b>Porcentaje de utilidad</b>	<b>Costo día (USD)</b>	<b>Días utilizados</b>	<b>Costo uso (USD)</b>
Agitador magnético	Unidad	285	7	100,00%	0,11	70,15	7,82
Autoclave	Unidad	900	5	100,00%	0,49	79,7	39,30
Balanza de precisión	Unidad	120	7	100,00%	0,05	73,75	3,46
Cámara de flujo laminar	Unidad	12500	10	50,00%	3,42	153,3	525,00
Estufa	Unidad	150	10	100,00%	0,04	9	0,37
Microondas	Unidad	170	7	100,00%	0,07	73,75	4,91
pH-metro	Unidad	260	5	100,00%	0,14	73,75	10,51
Refrigeradora	Unidad	600	10	50,00%	0,16	65,75	10,81
Cámara de crecimiento	Unidad	2750	20	50,00%	0,38	359,56	135,45

**TOTAL: 737,64 USD**

**Anexo 11.** Costos fijos y variables en el rescate de germoplasma de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.2014.

COSTOS FIJOS				
RUBRO	UNIDAD	CANTIDAD	PRECIO UNITARIO (USD)	PRECIO TOTAL (USD)
<b>INSUMOS</b>				
Fertilizantes	Kg	40	0,4	16,00
Fungicidas	unidad	2	10	20,00
Subtotal				<b>36,00</b>
<b>MATERIALES</b>				
Vasos de Precipitación	unidad	8	0,09	0,685714286
Probetas	unidad	1	0,29	0,285714286
Puntas para micropipeta	unidad	2	0,16	0,32
Piseta	unidad	1	0,09	0,085714286
Pinzas	unidad	2	0,20	0,4
Mango de bisturí	unidad	1	0,14	0,142857143
Termómetro	unidad	1	0,06	0,057142857
Marcadores	unidad	1	0,60	0,6
Subtotal				<b>2,577142857</b>
<b>SERVICIOS</b>				
<b>SERVICIOS</b>				
Agua potable	m <sup>3</sup>	1	0,55	0,55
Luz eléctrica	kWh	100	0,04	4
Subtotal				<b>4,55</b>
<b>EQUIPOS</b>				
Depreciación de equipos	mensual	10	1	10,00
Subtotal				<b>10,00</b>
<b>SALARIO</b>				
Tesista	mensual	10	180	1800
Subtotal				<b>1800</b>
SUBTOTAL COSTOS FIJOS				<b>1853,13</b>
<b>COSTOS VARIABLES</b>				
RUBRO	UNIDAD	CANTIDAD	PRECIO UNITARIO (USD)	PRECIO TOTAL(USD)
<b>REACTIVOS</b>				
Medio Murashige & Skoog ½	litro	46	12,06	554,76
Bencilaminopurina (BAP)	g	0,001	0,0024	0,0000024
Ácido Giberélico (GA3)	g	0,005	0,009	0,000045
Ácido Indolbutírico (IBA)	g	0,1	0,004	0,0004
Ácido Naftalén acético (ANA)	g	0,05	0,004	0,0002
NaOH	litro	0,05	0,05	0,0025
HCl	litro	0,05	0,05	0,0025
Subtotal				<b>554,7656474</b>

Anexo 11 (Cont...)

<b>MATERIALES</b>				
Frascos 250 ml	unidad	200	0,05	10
Aluminio	60.9m*30.4cm	1	4,5	4,5
Parafilm Rollo	1400m*45cm	1	18	18
Alcohol potable	galón	1	12	12
Hipoclorito de sodio	galón	1	5	5
Detergente	kg	1	3	3
Hojas de bisturí	unidad	5	0,19	0,95
Gas	tanque	1	2	2
Servilletas	unidad	2	0,35	0,7
Mascarilla	unidad	2	0,05	0,1
Gorro	unidad	2	0,25	0,5
Subtotal				<b>56,75</b>
SUBTOTAL C. VARIABLES				611,5156474
C. FIJOS + C. VARIABLES				2464,64
Imprevistos 5 %				123,23
				<b>2587,87</b>
Costo de brotes en laboratorio				<b>US\$ 1,34</b>

**Anexo 12.** Costos que varían para la fase de desinfección en el rescate de germoplasma de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.2014.

Tratamientos	unidad	cantidad	costo unitario	costo total
<b>Tratamiento 1</b>				
cloro	ml	10	0,009	0,09
alcohol	ml	150	0,0024	0,36
fungicidas	ml	3	0,04	0,12
bactericidas	g	0,5	0,004	0,002
agua destilada	ml	4000	0,00012	0,48
			Total	<b>1,052</b>
<b>Tratamiento 2</b>				
cloro	ml	10	0,009	0,09
alcohol	ml	150	0,0024	0,36
fungicidas	ml	3	0,04	0,12
bactericidas	g	0,5	0,004	0,002
agua destilada	ml	4000	0,00012	0,48
			Total	1,052
<b>Tratamiento 3</b>				
cloro	ml	15	0,009	0,135
alcohol	ml	150	0,0024	0,36
fungicidas	ml	3	0,04	0,12
bactericidas	g	0,5	0,004	0,002
agua destilada	ml	4000	0,00012	0,48
			Total	1,097

Anexo 12. (Cont...)

<b>Tratamiento 4</b>				
cloro	ml	15	0,009	0,135
alcohol	ml	150	0,0024	0,36
fungicidas	ml	3	0,04	0,12
bactericidas	g	0,5	0,004	0,002
agua destilada	ml	4000	0,00012	0,48
			Total	1,097
<b>Tratamiento 5</b>				
cloro	ml	20	0,009	0,18
alcohol	ml	150	0,0024	0,36
fungicidas	ml	3	0,04	0,12
bactericidas	g	0,5	0,004	0,002
agua destilada	ml	4000	0,00012	0,48
			Total	1,142
<b>Tratamiento 6</b>	6			
cloro	ml	20	0,009	0,18
alcohol	ml	150	0,0024	0,36
fungicidas	ml	3	0,04	0,12
bactericidas	g	0,5	0,004	0,002
agua destilada	ml	4000	0,00012	0,48
			Total	1,142
			Subtotal 1	1,052
			Subtotal 2	1,052
			Subtotal 3	1,097
			Subtotal 4	1,097
			Subtotal 5	1,142
			Subtotal 6	1,142
			<b>Total</b>	<b>6,582</b>

**Anexo 13.** Costos variables para la fase de multiplicación en el rescate de germoplasma de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tegidos in vitro. Quito, Pichincha.2014.

Tratamientos	unidad	cantidad	costo unitario	costo total
<b>Tratamiento 1</b>				
MSM	l	4	1,97	7,8612158
BAP	mg	0	0,0024	0
AG3	mg	1,5	0,009	0,0135
			Total	7,8747158
<b>Tratamiento 2</b>				
MSM	l	4	1,97	7,8612158
BAP	mg	0,5	0,0024	0,0012
AG3	mg	1,5	0,009	0,0135
			Total	7,8759158
<b>Tratamiento 3</b>				
MSM	l	4	1,97	7,8612158
BAP	mg	0,5	0,0024	0,0012
AG3	mg	1,5	0,009	0,0135
			Total	7,8759158



Anexo 13. (Cont...)

<b>Tratamiento 4</b>				
MSM	l	4	1,97	7,8612158
BAP	mg	1	0,0024	0,0024
AG3	mg	1,5	0,009	0,0135
			Total	7,8771158
<b>Tratamiento 5</b>				
CHU	l	4	1,80	7,2
BAP	mg	0	0,0024	0
AG3	mg	1,5	0,009	0,0135
			Total	7,2135
<b>Tratamiento 6</b>				
CHU	l	4	1,80	7,2
BAP	mg	0,5	0,0024	0,0012
AG3	mg	1,5	0,009	0,0135
			Total	7,2147
<b>Tratamiento 7</b>				
CHU	l	4	1,80	7,2
BAP	mg	1	0,0024	0,0024
AG3	mg	1,5	0,009	0,0135
			Total	7,2159
<b>Tratamiento 8</b>				
CHU	l	4	1,80	7,2
BAP	mg	1,5	0,0024	0,0036
AG3	mg	1,5	0,009	0,0135
			Total	7,2171
			Subtotal 1	7,87
			Subtotal 2	7,88
			Subtotal 3	7,88
			Subtotal 4	7,88
			Subtotal 5	7,21
			Subtotal 6	7,21
			Subtotal 7	7,22
			Subtotal 8	7,22
			<b>Total</b>	<b>45,9318632</b>

**Anexo 14.** Datos obtenidos para la variable brotación en el rescate de germoplasma de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.1014.

Observaciones						
Tratamientos	1	2	3	4	5	6
1	8	10,00	10,00	10,00	10,00	8,00
2	10	14,00	10,00	14,00	14,00	10,00
3	14	14,00	16,00	16,00	16,00	16,00
4	26	26,00	26,00	26,00	30,00	30,00
5	10	8,00	10,00	10,00	8,00	8,00
6	10	14,00	14,00	10,00	10,00	14,00
7	14	16,00	14,00	16,00	18,00	18,00
8	26	26,00	26,00	30,00	30,00	30,00

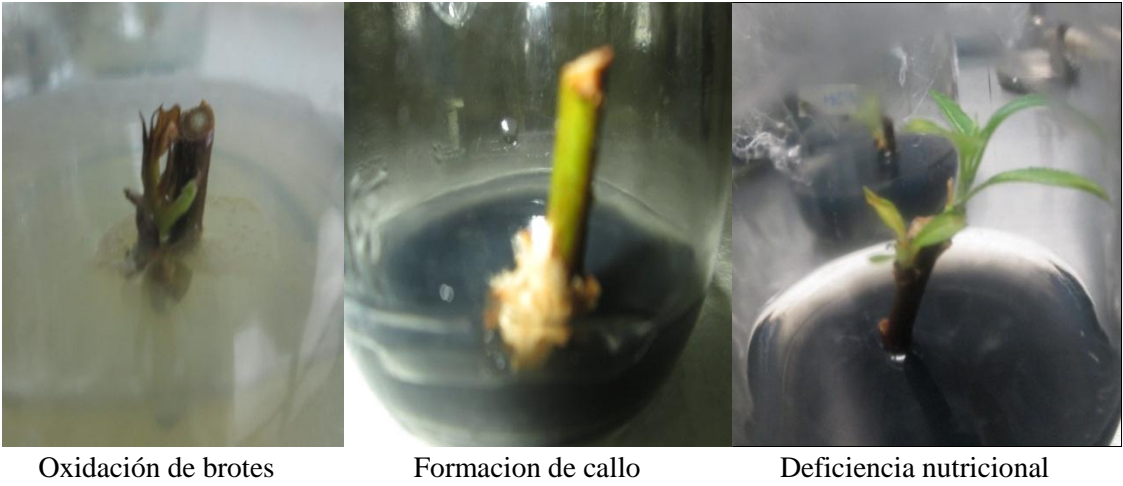
**Anexo 15.** Datos obtenidos para la variable longitud de brotes contaminación en el rescate de germoplasma de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.1014.

Observaciones						
Tratamientos	1	2	3	4	5	6
1	1,55	1,73	1,79	1,67	1,79	1,58
2	1,58	1,73	2,24	1,87	1,73	1,79
3	2,19	2,39	2,24	2,49	2,32	2,45
4	1,09	1,14	1,34	0,84	1,10	0,71
2	2,14	1,95	1,61	1,87	1,73	1,58
6	1,94	1,64	1,95	2,12	2,12	1,90
7	2,68	2,45	2,55	2,61	2,24	2,41
8	0,948	1,18	1,18	0,77	1,10	1,00

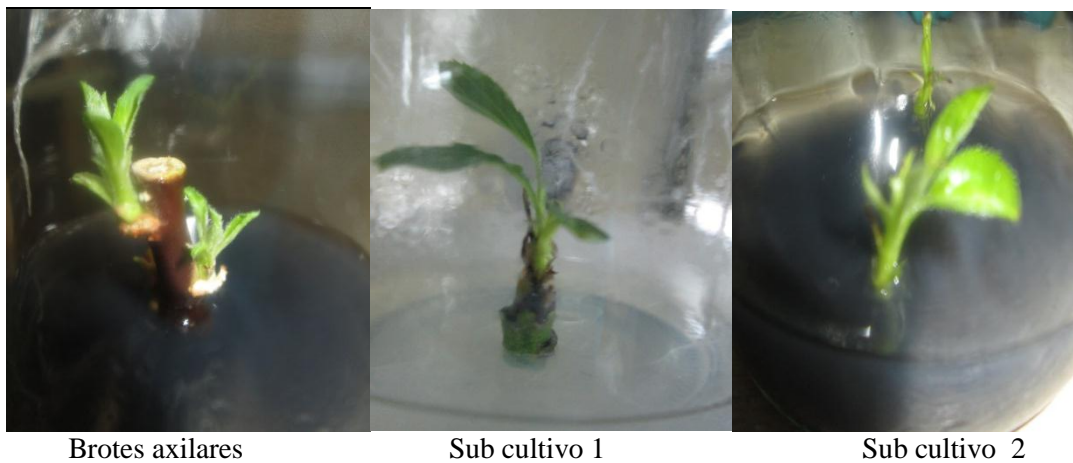
**Anexo 16.** Datos obtenidos para la variable número de brotes en el rescate de germoplasma de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim) mediante cultivo de tejidos in vitro. Quito, Pichincha.1014.

Observaciones						
Tratamientos	1	2	3	4	5	6
1	2	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
2	1	2,00	2,00	2,00	1,00	2,00
3	3	2,00	2,00	3,00	2,00	2,00
4	2	1,00	2,00	1,00	2,00	1,00
5	1	2,00	2,00	2,00	1,00	1,00
6	2	1,00	2,00	2,00	1,00	2,00
7	3	2,00	2,00	2,00	3,00	2,00
8	1	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00

**Anexo 17.** Fotografías de dificultades encontradas durante la fase de inducción de brotes de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014.



**Anexo 18.** Fotografía del desarrollo de brotes manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014.



**Anexo 19.** Inicio de la fase de enraizamiento de brotes manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014.



**Anexo 20.** Aclimatación de brotes enraizados de manzana Emilia (*Malus communis*-Reineta amarilla de Blenheim). Quito, Pichincha.2014

